

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGELA MARIA DE SOUZA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *Eugenia pyriformis*
CAMBESS., MYRTACEAE E ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO SINÉRGICA COM
AGENTES ANTIBACTERIANOS E ANTIFÚNGICOS DE USO CLÍNICO

CURITIBA

2013

ANGELA MARIA DE SOUZA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *Eugenia pyriformis*
CAMBESS., MYRTACEAE E ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO SINÉRGICA COM
AGENTES ANTIBACTERIANOS E ANTIFÚNGICOS DE USO CLÍNICO

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de
Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel
Co-orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA

2013

Souza, Ângela Maria de
Avaliação do potencial antimicrobiano de *Eugenia pyriformis*
Cambess, Myrtaceae e estudo da associação sinérgica com agentes
antibacterianos e antifúngicos de uso clínico / Ângela Maria de Souza -
Curitiba, 2013.

118 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do
Paraná, 2013.

Inclui bibliografia

1. *Eugenia pyriformis* Cambess. 2. Atividade antimicrobiana.
3. Interações de sinergismo. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Miguel,
Obdulio Gomes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.32

TERMO DE APROVAÇÃO

ANGELA MARIA DE SOUZA

Título: "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EUGENIA PYRIFORMIS CAMBESS, MYRTACEAE E ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO SINÉRGICA COM AGENTES ANTIBACTERIANOS E ANTIFÚNGICOS DE USO CLÍNICO"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insurnos, Medicamentos e Correlatos.


Prof.ª Dr.ª Marilis Dallarmi Miguel
Orientadora


Prof.ª Dr.ª Sandra Maria Warumby Zanin
Universidade Federal do Paraná


Prof.ª Dr.ª Laura Lúcia Cogo
Universidade Integrada do Brasil - UNIBRASIL

Curitiba, 11 de setembro de 2013.

À meus pais, Hamilton e Dirce,
incentivadores incansáveis dos meus
estudos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por conceder-me força, capacidade física e intelectual, primordiais para conquistar meus sonhos.

Aos meus pais, Hamilton e Dirce, alicerces da minha vida. Obrigada pelo amor incondicional, pelo exemplo de luta, pelo incentivo, pela minha formação e acima de tudo por terem me ensinado que a felicidade está na simplicidade da vida. Vocês são essenciais na minha vida!

Ao meu querido irmão, Marcos e meus sobrinhos Diogo, Santhiago e Gabriel, que são parte da alegria e felicidade do meu dia a dia.

Ao meu namorado Arnaldo, companheiro e amigo nos sonhos e realizações. Pelo carinho que me traz tranquilidade e pelo companheirismo que me fortalece.

Aos meus orientadores Prof^a. Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel e Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel pela orientação, ensinamentos, carinho, amizade e principalmente pela confiança depositada em mim.

À minha grande amiga Dr^a. Laura Lúcia Cogo, pelo companheirismo, incentivo, paciência, carinho e amizade, e principalmente pelo suporte e apoio incondicional em todos os momentos.

À Prof^a. Dr^a. Cristina Leise Bastos Monteiro por ter me despertado o interesse pelo mestrado.

À Lorene Armstrong pela confiança e oportunidade em aprofundar os estudos microbiológicos com as amostras de sua dissertação.

Aos amigos da Seção de Bacteriologia do Hospital de Clínicas da UFPR pelo carinho que me receberam desde o primeiro dia, pela amizade, pelo apoio e pelos bons momentos partilhados que tornaram a execução deste trabalho tão especial. Teria sido bem mais difícil sem a companhia de vocês.

À Dr^a. Marisol Dominguez Muro e aos amigos da Seção de Micologia do Hospital de Clínicas da UFPR pela constante disposição, apoio e atenção.

Aos companheiros de trabalho da Seção de Hematologia do Hospital de Clínicas da UFPR por entenderem a minha ausência nas tarefas de rotina e que torceram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

Aos colegas da Seção de Central de Soluções e Meios de Cultura do Hospital de Clínicas da UFPR, por terem me ajudado, sempre que necessário.

Aos colegas Alexandra e Fernando, que muito colaboraram no andamento desse trabalho com as mais diversas formas de contribuição.

À Mônica Evelise da Silveira, responsável pela Unidade de Apoio Diagnóstico e a Dr^a. Helena Homem de Mello de Souza responsável pela Seção de Bacteriologia do Hospital de Clínicas da UFPR, pelo apoio constante e por ter permitido a realização da pesquisa neste serviço.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPR Prof. Dr. Roberto Pontarolo e aos professores, funcionários e colegas pelo conhecimento transmitido e amizade.

Aos meus amigos, que durante este período, não pude dar atenção que merecem.

E a todos que não foram citados, mas de alguma maneira contribuíram para a concretização desse sonho, sou eternamente grata.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas
usadas, que já têm a forma do nosso corpo e
esquecer os nossos caminhos, que nos levam
sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia:
e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para
sempre, à margem de nós mesmos”.

Fernando Pessoa

RESUMO

A espécie *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae, conhecida pelo nome popular de uvaia foi avaliada quanto à atividade antimicrobiana de seus extratos, frações e compostos isolados das folhas e caules e seu potencial sinérgico com agentes antimicrobianos de uso clínico. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelas técnicas da bioautografia e da microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 40175, *Candida krusei* ATCC 40147 e *Candida parapsilosis* ATCC 40038. Ao avaliar a atividade antibacteriana dos grupos testados pela técnica da microdiluição em caldo foi observado que a fração do extrato acetônico do caule e da folha, as frações hidroalcoólica e acetato de etila das folhas mostraram um bom potencial inibitório contra os micro-organismos Gram-positivos. A análise da atividade antifúngica demonstrou um bom potencial inibitório para os extratos brutos e extratos acetônicos com valores de CIM oscilando entre 7,81 e 62,5 µg/mL. A fração acetato de etila apresentou bom potencial inibitório somente para a folha, com CIM entre 31,25 e 62,5 µg/mL. Os compostos isolados não apresentaram atividade antimicrobiana para os micro-organismos testados. A técnica da bioautografia revelou amostras com presença de atividade inibitória que contrastam com os resultados obtidos na determinação da CIM. Os resultados obtidos pela técnica da bioautografia mostram halos de inibição de crescimento em todas as amostras de extratos, frações e compostos isolados de *E. pyriformis* contra os micro-organismos Gram-positivos testados. Para as frações hexano e clorofórmio de caule e a fração hidroalcoólica de folha também foram observados halos de inibição contra *C. albicans*. Estas amostras não mostraram atividade antimicrobiana pela técnica da microdiluição em caldo nas CIMs analisadas. O estudo do potencial sinérgico de *E. pyriformis* foi realizado pela técnica *Checkerboard* para a determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI), em associação com a Vancomicina frente a *E. faecalis* e *S. aureus* e em associação com o Fluconazol frente a *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Neste estudo foram observadas interações de sinergismo na associação da fração hidroalcoólica de folha e Vancomicina com FICI de 0,3749 frente a *E. faecalis* e nas associações do Fluconazol com extrato bruto de folha frente a *C. krusei* e *C. parapsilosis*, extrato acetônico de folha frente a *C. krusei* e fração acetato de etila de folha frente a *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* com valores de FICI oscilando entre 0,2491 e 0,4996 µg/mL. Nas demais combinações testadas foram observadas interações de aditividade e antagonismo. Os extratos e frações de *E. pyriformis* foram capazes de inibir *in vitro* o crescimento de bactérias e fungos demonstrando de maneira eficaz sua atividade antimicrobiana, além de apresentar capacidade de exercer ação interferente sobre a atividade antibacteriana e antifúngica dos antimicrobianos, seja através de um efeito antagônico ou sinérgico.

Palavras-chave: *Eugenia pyriformis* Cambess. Atividade antimicrobiana. Interações de sinergismo.

ABSTRACT

The *Eugenia pyriformis* Cambess. species, Myrtaceae, also known by the popular name of uvaia was evaluated regarding the antimicrobial activity of its extracts, fractions and compounds isolated from leaves and stems and their potential synergistic with clinical use of antimicrobial agents. The antimicrobial activity was performed using the bioautography and broth microdilution method for determination the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 40175, *Candida krusei* ATCC 40147 and *Candida parapsilosis* ATCC 40038. To evaluate the antibacterial activity of the groups tested by the broth microdilution technique it was observed that the fraction of the acetone extract of the stem and leaf, fractions hydroalcoholic and ethyl acetate leaves showed a good inhibitory potential for Gram-positive strains. The analysis of the antifungal activity showed a good inhibitory potential for the crude extracts and acetonic extract with MIC values ranging from 7.81 and 62.5 µg/mL. The ethyl acetate fraction showed good inhibitory potential only for the leaves, with MICs between 31.25 and 62.5 µg/mL. The isolated compounds showed to be inactive for the tested microorganisms. The technique of bioautography samples revealed the presence of inhibitory activity in contrast with the results obtained by determination of the MIC. The results obtained by the technique of bioautography show zones of inhibition of growth in all samples of extracts, fractions and compounds isolated from *E. pyriformis* against strains of Gram-positive tested. For hexane and chloroform fractions of stem and hydroalcoholic fraction of leaves were also observed inhibition zones against *C. albicans*. These samples showed no antimicrobial activity by the broth microdilution technique for the MICs analyzed. The study of the synergistic potential of *E. pyriformis* was evaluated by *Checkerboard* technique for the determination of Fractional Inhibitory Concentration Index, in combination with vancomycin against *E. faecalis* and *S. aureus* and in combination with fluconazole against *C. albicans*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*. In this study, were observed to interactions synergistically in the combination fraction hydroalcoholic leaves and Vancomycin with FICI of 0.3749 against *E. faecalis* and associations of Fluconazole with crude extract of leaves against *C. krusei* and *C. parapsilosis*, acetone extract of leaves against *C. krusei* and ethyl acetate fraction leaves against *C. albicans*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*, with FICIs between 0,2491 and 04996 µg/mL. In the other combinations tested were observed additive effect and antagonism. The extracts and fractions of *E. pyriformis* were able to inhibit *in vitro* the growth of bacteria and fungi, effectively demonstrating antimicrobial activity, and present ability to exercise interfering action on the antibacterial and antifungal activity of antimicrobial agents, either through a synergistic or antagonistic effects.

Key words: *Eugenia pyriformis* Cambess. Antimicrobial activity. Synergistic interaction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ALVOS CELULARES DOS COMPOSTOS NATURAIS NA CÉLULA BACTERIANA	27
FIGURA 2 -	<i>Eugenia pyriformis</i> CAMBESS., MYRTACEAE	31
FIGURA 3 -	EXCICATA <i>E. pyriformis</i> (MBM 204990)	47
FIGURA 4 -	β -AMIRINA	49
FIGURA 5 -	FEOFITINA <i>a</i> E <i>b</i>	49
FIGURA 6 -	ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>E. pyriformis</i> PELA TÉCNICA DA BIOAUTOGRAFIA	60
FIGURA 7 -	ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO BRUTO DE CAULE DE <i>E. pyriformis</i> PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	63
FIGURA 8 -	ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO BRUTO DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	64
FIGURA 9 -	ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATO BRUTO DE <i>E. pyriformis</i> PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	66
FIGURA 10 -	ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATO ACETÔNICO DE <i>E. pyriformis</i> PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO.....	67
FIGURA 11 -	ENSAIO DO POTENCIAL SINÉRGICO DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> E VANCOMICINA FRENTE A <i>E. faecalis</i> PELA TÉCNICA CHECKERBOARD	73
FIGURA 12 -	ENSAIO DO POTENCIAL SINÉRGICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> E VANCOMICINA FRENTE A <i>S. aureus</i> PELA TÉCNICA CHECKERBOARD	73
FIGURA 13 -	VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE CAULE DE <i>E. pyriformis</i> COM VANCOMICINA FRENTE A <i>E. faecalis</i> E <i>S. aureus</i>	74

FIGURA 14 -	VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> COM VANCOMICINA FRENTE A <i>E. faecalis</i> E <i>S. aureus</i>	75
FIGURA 15 -	VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> COM VANCOMICINA FRENTE A <i>E. faecalis</i> E <i>S. aureus</i>	76
FIGURA 16 -	ENSAIO DO POTENCIAL SINÉRGICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> E FLUCONAZOL FRENTE A <i>C. albicans</i> PELA TÉCNICA CHECKERBOARD	78
FIGURA 17 -	ENSAIO DO POTENCIAL SINÉRGICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> E FLUCONAZOL FRENTE A <i>C. krusei</i> PELA TÉCNICA CHECKERBOARD	78
FIGURA 18 -	ENSAIO DO POTENCIAL SINÉRGICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> E FLUCONAZOL FRENTE A <i>C. parapsilosis</i> PELA TÉCNICA CHECKERBOARD	79
FIGURA 19 -	VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE CAULE DE <i>E. pyriformis</i> COM FLUCONAZOL FRENTE A <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> E <i>C. parapsilosis</i>	80
FIGURA 20 -	VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> COM FLUCONAZOL FRENTE A <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> E <i>C. parapsilosis</i>	81
FIGURA 21 -	VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE CAULE DE <i>E. pyriformis</i> COM FLUCONAZOL FRENTE A <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> E <i>C. parapsilosis</i>	82
FIGURA 22 -	VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> COM FLUCONAZOL FRENTE A <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> E <i>C. parapsilosis</i>	83
FIGURA 23 -	VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> COM FLUCONAZOL FRENTE A <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> E <i>C. parapsilosis</i>	84

FIGURA 24 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE CAULE DE <i>E. pyrifomis</i> E VANCOMICINA COM <i>E. faecalis</i>	85
FIGURA 25 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE FOLHA DE <i>E. pyrifomis</i> E VANCOMICINA COM <i>E. faecalis</i>	86
FIGURA 26 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>E. pyrifomis</i> E VANCOMICINA COM <i>E. faecalis</i>	86
FIGURA 27 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DE FOLHA DE <i>E. pyrifomis</i> E VANCOMICINA COM <i>E. faecalis</i>	87
FIGURA 28 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE CAULE DE <i>E. pyrifomis</i> E VANCOMICINA COM <i>S. aureus</i>	88
FIGURA 29 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DE FOLHA DE <i>E. pyrifomis</i> E VANCOMICINA COM <i>S. aureus</i>	89
FIGURA 30 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>E. pyrifomis</i> E VANCOMICINA COM <i>S. aureus</i>	90
FIGURA 31 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE CAULE DE <i>E. pyrifomis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. albicans</i>	91
FIGURA 32 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE FOLHA DE <i>E. pyrifomis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. albicans</i>	92
FIGURA 33 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE FOLHA DE <i>E. pyrifomis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. albicans</i>	92
FIGURA 34 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE CAULE DE <i>E. pyrifomis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. albicans</i>	93
FIGURA 35 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>E. pyrifomis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. albicans</i>	94

FIGURA 36 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE CAULE DE <i>E. pyriformis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. krusei</i>	95
FIGURA 37 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE CAULE DE <i>E. pyriformis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. krusei</i>	95
FIGURA 38- ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. krusei</i>	96
FIGURA 39 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. krusei</i>	97
FIGURA 40 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. krusei</i>	97
FIGURA 41 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE CAULE DE <i>E. pyriformis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. parapsilosis</i>	98
FIGURA 42 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. parapsilosis</i>	99
FIGURA 43 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE CAULE DE <i>E. pyriformis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. parapsilosis</i>	100
FIGURA 44 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. parapsilosis</i>	100
FIGURA 45 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>E. pyriformis</i> E FLUCONAZOL COM <i>C. parapsilosis</i>	101

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	SCREENING FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES DA FOLHA E DO CAULE DE <i>Eugenia pyriformis</i> CAMBESS.	32
QUADRO 2 -	SCREENING FITOQUÍMICO DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHA E DE CAULE DE <i>Eugenia pyriformis</i> CAMBESS.	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHA DE <i>Eugenia pyriformis</i> CAMBESS.	34
TABELA 2 -	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DO CAULE E FOLHAS DE <i>Eugenia pyriformis</i> CAMBESS. PELA TÉCNICA DA BIOAUTOGRAFIA	59
TABELA 3 -	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DO CAULE E FOLHAS DE <i>Eugenia pyriformis</i> CAMBESS.	62
TABELA 4 -	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (FIC) E ÍNDICES FIC PARA OS MICRO-ORGANISMOS GRAM-POSITIVOS	69
TABELA 5 -	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (FIC) E ÍNDICES FIC PARA OS FUNGOS LEVEDURIFORMES	70

LISTA DE SIGLAS

ATCC	- <i>American Type Culture Colection</i>
BM	- Banho-maria
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CLSI	- <i>Clinical Laboratory Standarts Institute</i>
cm	- Centímetro
DMSO	- Dimetilsulfóxido
EA	- Extrato Acetônico
EB	- Extrato Etanólico Bruto
FAE	- Fração Acetato de Etila
FC	- Fração Clorofórmio
FH	- Fração Hidroalcoólica
FHE	- Fração Hexano
FIC	- Concentração Inibitória Fracionada
FICI	- Índice de Concentração Inibitória Fracionada
GL	- Gay-Lussac Lei Volumétrica
G	- Gramas
°C	- Grau Celsius
H ₂ SO ₄	- Ácido sulfúrico
IC	- Coeficiente alfa
Kg	- Kilograma
M	- metro
MHB	- Caldo Mueller Hinton
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina
mg	- Miligrama
mL	- Mililitros
mm	- Milímetros
µL	- Microlitro
µg	- Microgramas
µm	- Micrometro
nm	- Nanômetros

PA	- Padrão Analítico
%	- Porcentagem
pH	- Potencial Hidrogeniônico
RNM 13C	- Ressonância Nuclear Magnética de Carbono 13
RNM 1H	- Ressonância Nuclear Magnética de Hidrogênio
RSM	- Modelo de Resposta de Superfície
TTC	- Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio
UFC	- Unidade formadora de colônias
UV	- Ultravioleta
v/v	- Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVO GERAL	21
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	PLANTAS MEDICINAIS	22
2.2	QUÍMICA DE PLANTAS MEDICINAIS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	23
2.3	MECANISMOS DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINAIS	25
2.4	FAMÍLIA MYRTACEAE	27
2.5	GÊNERO <i>Eugenia</i>	29
2.6	<i>Eugenia pyriformis</i> CAMBESS.	30
2.7	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	35
2.7.1	Métodos de difusão	36
2.7.2	Métodos de diluição	38
2.7.3	Métodos bioautográficos	39
2.7.4	Métodos usados para medir a atividade antimicrobiana de combinações	40
2.7.4.1	Método <i>Checkerboard</i>	40
2.7.4.2	Método <i>Time-kill</i>	42
2.7.4.3	<i>Etest (Epsilometer strip test)</i>	44
2.8	TERAPIA COMBINADA	44
3	MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1	MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO	47
3.2	MICRO-ORGANISMOS	50

3.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA TÉCNICA DA BIOAUTOGRAFIA	50
3.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PELA TÉCNICA DA MICRODILUIÇÃO	51
3.4.1	Atividade antibacteriana	51
3.4.2	Atividade antifúngica	52
3.4.3	Interpretação dos resultados	52
3.5	DETERMINAÇÃO DAS CIMs DOS ANTIMICROBIANOS	53
3.6	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO PELA TÉCNICA <i>CHECKERBOARD</i>	54
3.6.1	Atividade antibacteriana	54
3.6.2	Atividade antifúngica	55
3.6.3	Análise dos resultados	55
3.6.4	Construção do isoblograma	56
3.7	LEITURA DOS RESULTADOS	57
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA TÉCNICA DA BIOAUTOGRAFIA	58
4.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	61
4.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO PELA TÉCNICA <i>CHECKERBOARD</i>	68
5	CONCLUSÃO	103
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXO	118

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais produzem uma diversidade de compostos com atividades biológicas, os quais são empregados no desenvolvimento de medicamentos e representam uma fonte de grande importância para pesquisa de novos agentes antimicrobianos (ALVIANO; ALVIANO, 2009; KUETE, 2010; NEWMAN; CRAGG, 2012). Estes compostos derivam de várias vias metabólicas secundárias, e incluem alcalóides, flavonóides, ligninas, compostos fenólicos e terpenóides (SALEEM *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010).

A família Myrtaceae considerada a mais complexa do ponto de vista taxonômico apresenta em suas folhas uma grande quantidade de constituintes voláteis (SOUZA; LORENZI, 2005; STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009). Ela é amplamente encontrada nas Américas e Oceania e no Brasil é representada por 23 gêneros e mil espécies distribuídas por todo o país principalmente pela Mata Atlântica e restinga, sendo que, cerca de um terço destas espécies pertence ao gênero *Eugenia* (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; ROMAGNOLO; SOUZA, 2006; FARIAS *et al.*, 2009; ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012).

A espécie *Eugenia pyriformis* Cambess., representante desta família, é uma planta comum nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, conhecida pelo nome popular de uvaia, uvaieira, uvaia-do-campo, uvalha ou uvalha-do-campo (ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012). A planta é cultivada em pomares, empregada na medicina popular e seus frutos apresentam altos níveis de atividade antioxidante e compostos fenólicos (STEFANELLO *et al.*, 2009; ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012).

A uvaia é uma planta que pode ser utilizada em programas de reflorestamento, apresentando fácil cultivo e crescimento em jardins, seus frutos, ricos pelo seu valor nutritivo são utilizados na elaboração industrial de vários produtos (SOUZA; LORENZI, 2005) e suas folhas atuam no tratamento da gota (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 1987; THEODULOZ *et al.*, 1988).

As plantas medicinais foram utilizadas desde a antiguidade para o tratamento de doenças infecciosas comuns e tem sido desde há muito reconhecido que os óleos essenciais são capazes de retardar ou inibir o crescimento de bactérias, leveduras e fungos leveduriformes (PRASHAR *et al.*, 2003; SALEEM *et*

al., 2009; STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009; TIWARI *et al.*, 2009). O surgimento de resistência em muitos micro-organismos patogênicos estimulou a busca de novos agentes antimicrobianos em espécies de plantas (AGUIAR *et al.*, 2012).

A estratégia utilizada hoje em dia para o desenvolvimento de muitos fármacos é a busca por novas drogas que agem em vários alvos, para potencializar o efeito terapêutico. Assim o princípio da sinergia torna-se o grande desafio contemporâneo na descoberta de novos agentes terapêuticos (BIAVATTI, 2009). O uso associado de plantas medicinais, além de seus compostos derivados e drogas antimicrobianas pode inibir ou intensificar o efeito terapêutico das drogas antimicrobianas convencionais, através de efeitos benéficos, como a amplificação sinérgica ou a diminuição de possíveis efeitos adversos secundários (ZAGO *et al.*, 2009; OLAJUYIGBE; AFOLAYAN, 2012).

O Brasil, país de rica biodiversidade, possui em seu território um patrimônio inestimável de recursos, entretanto muito pouco se conhece desta diversidade (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003; BIESKI *et al.*, 2012). Estudos de bioprospecção de drogas a partir da flora brasileira, como *Eugenia pyriformis* Cambess., representam possibilidades concretas na descoberta de agentes antimicrobianos, que tenham aplicação no combate a diferentes micro-organismos, como as bactérias e fungos ou pela associação com antimicrobianos atualmente empregados no tratamento das doenças infecciosas.

Diante da importância da família Myrtaceae e devido aos escassos estudos realizados até o presente, esta planta representa um grande potencial para exploração e, um campo promissor no desenvolvimento de agentes antimicrobianos ou em associação com determinados fármacos antimicrobianos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos, frações e substâncias isoladas obtidos do caule e das folhas de *Eugenia pyriformis* Cambess. contra cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos leveduriformes e investigar seu potencial para provocar interação medicamentosa com agentes antibacterianos e antifúngicos de uso clínico.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas obtidas a partir do caule e das folhas contra cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos leveduriformes pela técnica da bioautografia.
- Determinar a concentração inibitória mínima dos extratos, frações e substâncias isoladas pela técnica de microdiluição em caldo.
- Investigar presença de sinergismo através da associação dos produtos de *Eugenia pyriformis* Cambess. com antibacterianos e antifúngicos de uso clínico pela técnica *Checkerboard*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

As ervas e plantas têm sido usadas desde os primórdios da humanidade e, ainda são empregadas em todo o mundo para a promoção da saúde e tratamento de doenças. Plantas e fontes naturais formam a base da medicina moderna, muitas plantas tradicionalmente empregadas como remédios, tornaram-se medicamentos modernos através do desenvolvimento de drogas, como exemplos notáveis a morfina, digoxina, colchicina e artemisina (WACHTEL-GALOR; BENZIE, 2011). Estima-se que 25% das drogas prescritas no mundo são derivadas de plantas, sendo que de um total de 252 drogas listadas como medicamentos essenciais pela Organização Mundial de Saúde, 11% são derivados exclusivamente das plantas (SAHOO *et al.*, 2010).

As plantas medicinais são reservatórios de compostos biológicos ativos com propriedades bioquímicas e terapêuticas. Estas propriedades incluem compostos antimicrobianos e antioxidantes, que são cada vez mais aproveitadas em benefício humano (OYEDEMI *et al.*, 2012). Elas são empregadas para o tratamento de várias doenças crônicas e agudas, incluindo a doença cardiovascular, problemas de próstata, depressão, inflamação, desordens respiratórias e doenças infecciosas (KAROU *et al.*, 2012).

Os medicamentos fitoterápicos são comumente utilizados na Europa, como na Alemanha e França e, em países mais desenvolvidos podem ser encontrados óleos essenciais, extratos ou chás de ervas vendidos em farmácias como medicamentos convencionais (WACHTEL-GALOR; BENZIE, 2011). No Brasil, uma grande quantidade de plantas, na forma de extratos brutos, infusões ou emplastros vêm sendo utilizadas para o tratamento de infecções comuns e a fitoterapia representa uma parte importante do setor econômico, em decorrência do aumento em sua popularidade como forma alternativa nos cuidados de saúde (LIMA *et al.*, 2006).

As plantas podem ser processadas e administradas de diferentes maneiras, incluindo a planta por inteiro, chás, xarope, óleos essenciais, pomadas, bálsamos,

cápsulas e, comprimidos contendo a matéria prima ou o extrato seco. Os extratos de plantas variam de acordo com o solvente utilizado para extração, a temperatura e o tempo de extração, podem ser extratos alcoólicos (tinturas), vinagres (extratos de ácido acético), extratos de água quente (tisanas), extrato fervido em longo prazo, geralmente raízes ou casca (decoção), a infusão fria e de plantas (macerados) (WACHTEL-GALOR; BENZIE, 2011).

O uso popular de plantas para a obtenção dos mais variados efeitos medicamentosos tem sido estudado cientificamente, incluindo sua aplicação como antimicrobianos (BURT, 2004; ALVARENGA *et al.*, 2007). O uso de plantas medicinais, muitas delas cultivadas no fundo do quintal é prática secular baseada no conhecimento popular e transmitida oralmente, na maior parte das situações. Numa população com baixo acesso a medicamentos, como a brasileira, agregar garantias científicas a essa prática terapêutica traz variadas vantagens, como baixo custo e fácil acesso, diminuição de efeitos adversos e evitar ou diminuir os riscos de intoxicação por uso inadequado (ALVARENGA *et al.*, 2007).

O Brasil é um país com uma grande biodiversidade, possuindo seis domínios ecológicos, sendo eles, a floresta Amazônica, Caatinga, Pampa, Cerrado, Mata Atlântica e o Pantanal. O estímulo à pesquisa de produtos naturais na biodiversidade brasileira, rica em matéria prima para a produção de fitofármacos, visa à obtenção de novos fármacos mais eficazes e específicos (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003; BIESKI *et al.*, 2012).

2.2 QUÍMICA DE PLANTAS MEDICINAIS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O metabolismo é a soma de todas as reações bioquímicas realizadas por um organismo, são divididas em vias metabólicas primárias e secundárias. As vias metabólicas primárias convergem poucos produtos finais, enquanto que as vias metabólicas secundárias originam muitos produtos (HUSSAIN *et al.*, 2012). A natureza produz a maioria das substâncias orgânicas conhecidas, o reino vegetal têm contribuído para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO *et al.*, 2002).

O metabolismo primário utiliza nutrientes de baixo peso molecular para suas atividades celulares e podem ocorrer através de três vias: a Embden Meyerhof-Parnas (EMP), a Entner-Doudoroff e a hexose de monofosfato (HMP) (HUSSAIN *et al.*, 2012). Os metabólitos primários são encontrados em todos os sistemas vivos, essenciais ao crescimento e à vida, como aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos, lípidios e vários outros (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003). Os metabólitos secundários são biossintetizados a partir dos metabólitos primários. Os produtos derivados do metabolismo secundário são misturas complexas de fitoquímicos farmacologicamente ativos, a maioria dos quais gerados através das via chiquimato, acetato de malonato e acetato de mevalonato. Os maiores grupos de fitoquímicos são os terpenos (sesquiterpenos, esteróides, carotenóides, saponinas e iridóides), compostos fenólicos (flavonóides, quinonas, xantonas, ligninas, quinolonas e salicilatos) e os alcalóides (KENNEDY; WIGHTMAN, 2011; FASINU; BOUIC; ROSENKRANZ, 2012).

Os terpenos ou isoprenóides terpênicos, representam a maior e mais diversificada classe de metabólitos, desempenham inúmeros papéis vitais nos processos metabólicos das plantas, incluindo respiração, fotossíntese, crescimento e desenvolvimento, reprodução, defesa e adaptação a condições ambientais (DUDAREVA *et al.*, 2005). Os terpenos de baixo peso molecular, como os monoterpenos com 10 carbonos e os sesquiterpenos com 15 carbonos são componentes voláteis de odores florais que atraem os polinizadores, estes são liberados a partir de tecidos vegetativos em resposta a ataque dos insetos herbívoros e funcionam como uma defesa indireta atraindo inimigos naturais de herbívoros (THOLL, 2006; GERSHENZON; DUDAREVA, 2007). Além dos benefícios ecológicos para as plantas, os compostos terpênicos são amplamente empregados por seres humanos como aromas, fragrâncias, produtos farmacêuticos, inseticidas e desinfetantes ou como precursores na produção de biomateriais e biocombustíveis (BOHLMANN; KEELING, 2008). Estes possuem diversas propriedades biológicas, incluindo efeitos quimiopreventivos para o câncer, antioxidante, antimicrobianos, antifúngicos, anti-hiperglicêmicos, antiviral, anti-inflamatórios e atividades antiparasitárias (LACIAR *et al.*, 2009).

Os flavonóides ocorrem amplamente no reino vegetal, são encontrados em frutas, legumes, nozes, sementes, caules e flores e representam um constituinte comum na dieta humana (TIM CUSHNIE; LAMB, 2005). Os compostos fenólicos são

biologicamente ativos e tem efeitos positivos sobre a saúde humana, interagindo com um número de alvos celulares e radicais livres, com propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Muitas pesquisas científicas têm encontrado resultados na doença coronariana e hipertensão arterial, diabetes, câncer, doenças inflamatórias, virais e parasitárias (CHAHAR *et al.*, 2011; OTLES; YALCIN, 2012; SIQUEIRA *et al.*, 2012), além da exploração de suas atividades antimicrobianas para o desenvolvimento de novos ingredientes para alimentos saudáveis, compostos médicos e farmacêuticos (SALEEM *et al.*, 2009; WEIDNER *et al.*, 2012).

Os alcalóides são um grupo de compostos altamente diversos que contém uma estrutura em anel e um átomo de azoto, na maioria dos casos localizado no interior da estrutura em anel do heterociclo. Os alcalóides tem ampla distribuição no reino vegetal e principalmente em plantas superiores. Vários alcalóides isolados de ervas naturais exibem efeitos antiproliferativos e antimetastáticos e outras atividades biológicas significativas, tais como o alívio na asma pela efedrina, a ação analgésica da morfina, os efeitos anticancerígenos da vinblastina, além de propriedades antibacterianas e antifúngicas, citotóxica, anti-agregante plaquetária e antiplasmódica (SILVA *et al.*, 2007; KUETE, 2010; LU *et al.*, 2012). O primeiro alcalóide reportado foi à morfina isolada da *Papaver somniferum* (papoula) é um analgésico muito potente e uma droga narcótica (SAALEM *et al.*, 2009; KUMAR; KHANUM, 2012).

Os grupos de fitoquímicos são economicamente importantes pela sua diversidade química, sendo utilizados na química farmacêutica, na nutracêutica como flavorizantes e fragrâncias, corantes e pigmentos, e também como pesticidas e aditivos alimentares (SALEEM *et al.*, 2009; HUSSAIN *et al.*, 2012).

2.3 MECANISMOS DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINAIS

Os metabólitos secundários das plantas podem contribuir no combate a bactérias patogênicas que afetam os seres humanos através de duas maneiras, como “potencializadores de atividade antimicrobiana”, favorecendo a atividade dos antimicrobianos e como “atenuadores de virulência”, adequando a resposta do

sistema imune do hospedeiro à invasão de patógenos (GONZALEZ-LAMOTHE *et al.*, 2009).

As propriedades antimicrobianas de plantas estão sendo amplamente pesquisadas, no entanto, há pouca informação disponível sobre os mecanismos de ação destes compostos antimicrobianos em bactérias e fungos (SÁNCHEZ; GARCÍA; HEREDIA, 2010).

O mecanismo de ação antimicrobiano dos óleos essenciais não é totalmente elucidado. Estes apresentam diferentes grupos de compostos químicos, sendo desta forma, sua atividade antibacteriana não atribuível a um único mecanismo de ação, mas em vários alvos celulares representados na Figura 1. O mecanismo de ação de compostos naturais pode agir na desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz, no fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula (BURT, 2004).

A atividade antimicrobiana dos terpenos está bem estabelecida. Vários estudos publicados descrevem a atividade biocida de terpenos e extratos de plantas ricas nessa substância (GREAY; HAMMER, 2011). Os compostos terpênicos apresentam propriedades lipofílicas sobre as membranas bacterianas, sendo seu local de ação a bicamada fosfolipídica da célula. Esta propriedade está diretamente relacionada à sua hidrofobicidade, que permite o rompimento dos lipídeos da membrana celular bacteriana, desintegrando suas estruturas e aumentando sua permeabilidade a prótons, íons e outros constituintes celulares. Este processo inclui a inibição de elétrons de transporte, a translocação da proteína, etapas de fosforilação e outras reações enzima dependentes (DORMAN; DEANS, 2000; GUINOISEAU *et al.*, 2010).

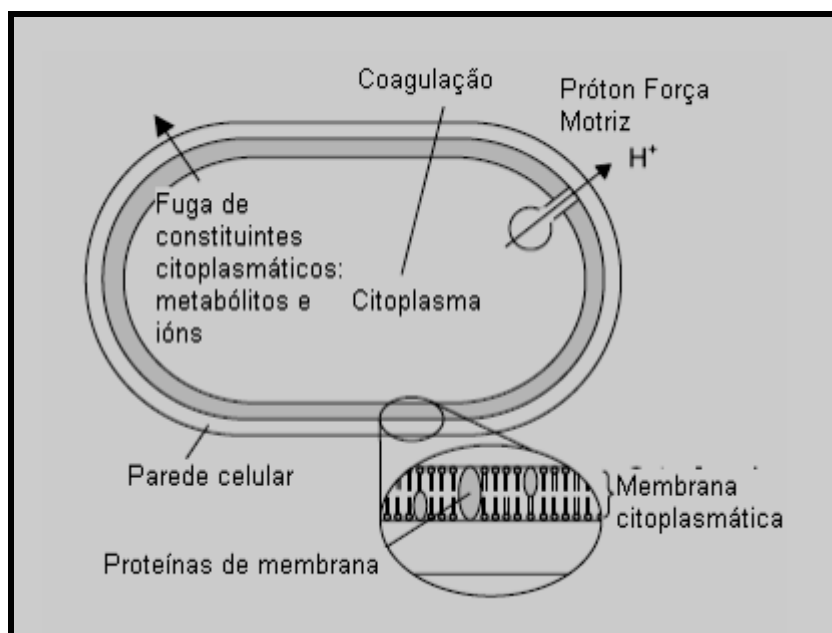


FIGURA 1 – ALVOS CELULARES DOS COMPOSTOS NATURAIS NA CÉLULA BACTERIANA

FONTE: BURT (2004)

Os compostos flavonóides atuam inibindo a síntese de ácidos nucleicos, alterando a membrana citoplasmática, ou ainda interferindo no metabolismo energético da bactéria (KUREK *et al.*, 2011; FOWLER *et al.*, 2011; HENDRA *et al.*, 2011). O anel B dos flavonóides, caracterizado pelo grupamento hidroxila da posição 3', pode interferir no empilhamento de bases de ácidos nucleicos, causando uma ação inibidora sobre a síntese de ácido desoxirribonucleico e ácido ribonucleico. Os alcalóides podem interagir com a membrana citoplasmática de bactérias, intercalar com o ácido desoxirribonucleico e inibir as bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus*. Os fenóis e ácidos fenólicos podem causar perturbação na produção de energia, através de reações com grupos sulfidril (SIMOES *et al.*, 2009).

2.4 FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae é uma família de pelo menos 133 gêneros e mais de 3800 espécies. Possui centros de distribuição na Austrália, sudeste da Ásia e sul da América, com pouca representação na África. No Brasil é representada por 23

gêneros e mil espécies distribuídas por todo o país principalmente pela Mata Atlântica e restinga, sendo que, cerca de um terço destas espécies pertence ao gênero *Eugenia* (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; LORENZI *et al.*, 2006; ROMAGNOLO; SOUZA, 2006; FARIAS *et al.*, 2009; ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012). As mirtáceas têm sido organizadas tradicionalmente em duas subfamílias Leptospermoideae e Myrtoideae e, no Brasil os representantes nativos pertencem à subfamília Myrtoideae (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A família é marcada por uma combinação de características, tais como folhas inteiras, perinérveas, de disposição alterna (gêneros não nativos) ou oposta, de margens inteiras e coloração sempre verde, com estípulas muito pequenas, cavidades secretoras com uma grande quantidade de constituintes voláteis, ovário ínfero, numerosos estames, floema interno e pontos sobre os vasos do xilema (WILSON *et al.*, 2001; SOUZA; LORENZI, 2005; STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009). Myrtaceae é uma das famílias lenhosas dominantes em várias formações vegetais brasileiras, mas geralmente não são produtoras de madeiras valiosas, restringindo-se ao fornecimento de lenha, por outro lado, há numerosas espécies frutíferas, algumas exploradas comercialmente como a goiabeira (*Psidium guajava* L.), a jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Beg.) e a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006).

Os frutos de todas as espécies brasileiras de Myrtaceae são carnosos, ou seja, frutos com sementes envolvidas por uma polpa carnosa tipicamente rica em água e carboidratos e pobre em proteínas e lipídios. O tamanho do fruto varia de 0,4 até 7,5 cm de largura e 0,4 a 8,0 cm de comprimento. A cor dos frutos é variável, incluindo preto, vermelho, amarelo, laranja, cinza e verde. As flores são hermafroditas, geralmente de cor branca, com estames numerosos, corola e cálice 4-5-mero e ovário ínfero. O tamanho das flores varia de pequeno, com diâmetro inferior a 1 cm, a relativamente grande, com diâmetro superior a 2 cm (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006).

Os representantes da família prosperam em solos contendo baixa quantidade de magnésio e fósforo, com pouca drenagem e baixa quantidade de nutrientes e são empregados de diversas formas, tais como medicinal, alimentícia, aromática e industrial (FARIAS *et al.*, 2009). As plantas da família Myrtaceae são

fontes de uma grande quantidade de compostos biologicamente ativos (HESKES *et al.*, 2012).

2.5 GÊNERO *Eugenia*

O gênero *Eugenia* é o um dos mais numerosos da família Myrtaceae, compreendendo cerca de 350 espécies nativas (MAGINA *et al.*, 2009), encontra-se representado nas diversas formações vegetais do Brasil, tanto pela sua riqueza específica, como pela abundância e frequência de suas espécies (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006).

Os frutos comestíveis de muitas de suas espécies são apreciados pelos homens e pelos animais silvestres, como a pitanga (*Eugenia uniflora* Lam.), cereja do mato (*Eugenia involucrata* DC), uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.), jambolão (*Eugenia jambolana* Lam.) e cambucá (*Eugenia edulis* Vell.) (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Estudos químicos com espécies de *Eugenia* revelaram a presença de flavonóides, taninos, terpenóides e óleos essenciais, enquanto que, estudos do ponto de vista farmacológico realizados com extratos brutos e compostos, comprovaram atividade anti-inflamatória, analgésica, antifúngica, antipirética, hipotensiva, antidiabética, antidiarreica, antireumática e antioxidante (RAVI; RAJASEKARAN; SUBRAMANIAN, 2005; LIMA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006; MAGINA *et al.*, 2009).

Algumas espécies como a *Eugenia brasiliensis* Lamarck, conhecida como Grumixama ou cereja brasileira, é uma árvore que cresce nas florestas da costa brasileira, e suas folhas, frutos, madeira e casca são usadas na medicina popular para tratar reumatismo, diarreia e também como diurético. A *Eugenia beaurepaireana* (Kiaerskou) Legrand é uma árvore popularmente chamada de ingabau ou Guamirim-ferro, sua utilização na América do Sul é recomendada para o tratamento de doenças inflamatórias, ulcerativas, e como adstringente. *Eugenia umbelliflora* (Berg), conhecida como baguaçu, é uma árvore que cresce no sul do Brasil, e os frutos são semelhantes a cerejas, com propriedades antibacterianas (MAGINA *et al.*, 2009).

2.6 *Eugenia pyriformis* CAMBESS.

A espécie *Eugenia pyriformis* Cambess., representante da família Myrtaceae é conhecida pelo nome popular de uvaia, uvaieira, uvaia-do-campo, uvalha ou uvalha-do-campo. A espécie é encontrada na Argentina, no Paraguai e no Brasil, nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (STEFANELLO *et al.*, 2009; ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012).

A árvore possui de 5 a 15 m de altura com copa arredondada, ramos com folhas simples, subcoriáceas e com a face inferior bem serícea, com característica velutina que revela um brilho particular (Figura 2). Suas flores são solitárias, axilares, pedunculadas e de cor branca. Florescem em novembro, dezembro e janeiro. Seu fruto é globoso e possui aproximadamente 2 cm de diâmetro, aspecto aveludado, polpa carnosa, contendo de uma a três sementes que apresentam tegumento de coloração castanha, cotilédones carnosos e justapostos. Amadurecem em janeiro e fevereiro, tornando-se amarelos. Os frutos são comestíveis e muito apreciados na forma de sucos, e também por várias espécies de pássaros, o que torna recomendável para reflorestamentos para recomposição da vegetação em áreas de preservação permanente (ROMANGNOLO; SOUZA, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010; ARMSTRONG, 2011).



FIGURA 2 - *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE
FONTE: ARMSTRONG (2011)

A planta é heliófita, seletiva higrófila e semidecídua, cultivada em pomares e empregada na medicina popular, seus frutos apresentam altos níveis de atividade antioxidante e compostos fenólicos (STEFANELLO *et al.*, 2009; ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012).

Os óleos essenciais das flores e frutos de *Eugenia pyriformis* apresentam em sua composição química sesquiterpenos em maior quantidade e monoterpenos em menor quantidade. Os constituintes principais são α -cadinol, δ -cadineno e β -cariofileno (STEFANELLO *et al.*, 2009; STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009). Pesquisas revelam também a presença de compostos flavonóides nas folhas da espécie, que possui a propriedade de inibir a xantina-oxidase, enzima envolvida na conversão da xantina em ácido úrico, sendo empregada no tratamento da gota (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 1987; THEODULOZ *et al.*, 1988).

Os resultados obtidos por Armstrong (2011) nos estudos de screening fitoquímico para os extratos hidroalcoólico e frações do caule e das folhas de *Eugenia pyriformis* Cambess. constam dos Quadros 1 e 2.

GRUPOS QUÍMICOS	EXTRATO HIDROALCOÓLICO	FRAÇÕES		
		Hexânica	Clorofórmica	Acetato de Etila
Alcalóides	-	-	-	-
Glicosídeos flavônicos	+	-	+	+
Cumarinas	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-
Esteróides/Triterpenóides	-	+	+	-
Desoxiaçúcares	-	-	+	-
Lactonas pentacíclicas	-	+	+	-

QUADRO 1 - SCREENING FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES DA FOLHA E DO CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS.

FONTE: ARMSTRONG (2011)

GRUPOS QUÍMICOS	EXTRATO AQUOSO
Glicosídeos antociânicos	-
Saponinas	+
Glicosídeos cianogênicos	-
Taninos	+
Ácidos fixos	+
Ácidos Voláteis	-

QUADRO 2 - SCREENING FITOQUÍMICO DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHA E DE CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS.

FONTE: ARMSTRONG (2011)

O screening fitoquímico revelou a presença de glicosídeos flavônicos e esteróides/triterpenóides no extrato hidroalcoólico da folha, enquanto que saponinas, taninos e ácidos fixos são detectados no extrato aquoso, tanto da folha como de caule de *E. pyriformis* (ARMSTRONG, 2011).

A maioria dos componentes químicos identificados no óleo essencial de folha de *Eugenia pyriformis* Cambess (Tabela 1) são derivados de compostos terpênicos, como os monoterpenos 1,8-cineol, linalol, terpinen-4-ol, e alguns sesquiterpenos não identificados. Foram isolados cinco compostos do extrato acetônico bruto das folhas de *E. pyriformis*: três da fração metanólica denominados de LA4D, LA16E e LA18A, e dois da fração acetônica que foram designados LA6A e LA7A. Destes, apenas três foram obtidos em quantidades suficientes para identificação: LA4D, LA6A e LA7A. No caule, foram encontrados os mesmos compostos, mas em quantidades insignificantes (ARMSTRONG, 2011).

TABELA 1 - COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS.

TEMPO DE RETENÇÃO (min)	COMPOSTO QUÍMICO	FÓRMULA
6,145	1,4-cicloexadieno-1-metil-4-(1-metil-etil)	C ₁₀ H ₁₆
6,411	<i>o</i> -cimeno	C ₁₀ H ₁₄
6,622	1,8-cineol	C ₁₀ H ₁₈ O
7,833	linalol	C ₁₀ H ₁₈ O
9,497	terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O
13,377	2-careno	C ₁₀ H ₁₆
14,470	terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆
14,531	di- <i>t</i> -butilacetileno	C ₁₀ H ₁₈
14,938	<i>p</i> -benzoquinona-2,6-di- <i>tert</i> -butil	C ₁₄ O ₂ H ₂
16,703	retinal	C ₂₀ H ₂₈ O
16,886	ni	C ₁₅ H ₂₂ O
18,414	<i>m</i> -metoxifenil-éter	C ₁₃ H ₁₂ O ₂
18,656	Ni	C ₁₃ H ₂₄ O
19,083	ni	C ₁₅ H ₂₄ O

NOTA: ni – não identificado

FONTE: ARMSTRONG (2011)

O composto denominado LA4D tem aspecto de pó branco e foi identificado como uma β -amirina. Os compostos LA6A e LA7A representam uma mistura, porém de acordo com o espectro foi possível observar a predominância de sinais em ambos, como em LA6A predominam os sinais de feofitina *a* e no composto LA7A, predominam sinais de feofitina *b* (ARMSTRONG, 2011).

O extrato etanólico bruto, as frações hexânica e hidroalcoólica de folha e o extrato etanólico bruto e a fração clorofórmica do caule não demonstraram efeitos citotóxicos frente à *Artemia salina*, para as demais frações estes efeitos foram

observados. As amostras foram consideradas com atividade citotóxica quando a DL50 apresentou valores inferiores a 1000 µg/mL (ARMSTRONG, 2011).

A atividade alelopática realizada com o extrato etanólico bruto e as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica de folha e caule, visando avaliar a influência destas amostras sobre as sementes de *Lactuca sativa* L., concluiu que nenhuma das amostras apresenta influência sobre a germinação destas sementes. As amostras não diferem estatisticamente dos controles e não revelam atividade sobre o crescimento do hipocótilo e da radícula das sementes de *L. sativa*. Somente a fração hexânica de caule inibiu o crescimento da radícula em proporção maior e na concentração de 0,4 mg (ARMSTRONG, 2011).

2.7 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana de produtos naturais pode ser avaliada por diferentes métodos laboratoriais *in vitro*, utilizados para determinar o potencial antimicrobiano (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003).

Os métodos não possuem a mesma sensibilidade e não são baseados sob o mesmo princípio, consequentemente os resultados obtidos podem ser influenciados por vários aspectos, levando a um decréscimo ou inibição da atividade antimicrobiana. Dentre estes, a origem da planta, época da coleta, partes da planta destinadas ao preparo do extrato, uso do material seco ou fresco, solventes e métodos de extração, pH de diluições, a metodologia empregada, os micro-organismos e cepas utilizadas, condições de cultivos (tempo de incubação, temperatura e taxa de oxigênio), meios de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados na emulsão óleo-água (FENNELL *et al.*, 2004; RIOS; RECIO, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados por diferentes grupos científicos, como o *Clinical Laboratory Standarts Institute* (CLSI), e são desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais de natureza hidrófila, como os antibióticos. Nos ensaios com substâncias vegetais, como os óleos essenciais, deve-se considerar que os óleos são voláteis, insolúveis em água, viscosos e complexos. As propriedades físicas são importantes para auxiliar na

avaliação da atividade antimicrobiana, assim, com a finalidade de melhorar a qualidade dos procedimentos, tornou-se necessária a utilização de solventes, detergentes ou agentes emulsificadores, como o Tween 20, Tween 80, dimetilsulfóxido e etanol para facilitar a dispersão dos mesmos no meio de cultura. A utilização destes emulsificadores podem causar possíveis interações com a substância em teste, bem como possuir atividade antimicrobiana. Para obter resultados confiáveis e uniformidade nos testes de atividade, esses fatores devem ser muito bem controlados, através da realização de controles negativos e positivos (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Os métodos comumente usados para avaliar a atividade antimicrobiana dos produtos vegetais são o de difusão, diluição e bioautografia (NASCIMENTO *et al.*, 2007; OSTROSKY *et al.*, 2008).

2.7.1 Métodos de difusão

O teste de difusão em ágar ou em placas é um método físico, que em meio sólido de cultura um micro-organismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa. O método fundamenta-se na difusão da substância, ocorrendo o aparecimento de um halo, onde não ocorreu crescimento do micro-organismo, denominado de halo de inibição (BARRY; THORNSBERRY, 1991; COLLINS, 1995).

Este método é empregado somente para micro-organismos de crescimento rápido e algumas bactérias fastidiosas. A preparação do inóculo deve ser feita a partir de 4 a 5 colônias da cultura do micro-organismo desafiado. Após o crescimento das colônias por 16 horas em caldo nutriente, os micro-organismos devem ser diluídos em água e ajustados a 0.5 na escala McFarland, que fornece densidade de aproximadamente 10^8 UFC/mL. As placas devem ser inoculadas em até 30 minutos após a padronização do inóculo (OSTROSKY *et al.*, 2008).

O teste é avaliado comparativamente a um antimicrobiano, como controle positivo, e o solvente utilizado no preparo dos extratos vegetais, como controle negativo. A leitura do halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de micro-organismos. Os resultados são qualitativos, estabelecendo a sensibilidade do micro-

organismo e não a potência antimicrobiana das amostras e dos antimicrobianos (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003; OSTROSKY *et al.*, 2008).

As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana são por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar (OSTROSKY *et al.*, 2008).

O teste de difusão em disco consiste em colocar discos de papel de filtro, impregnados com diferentes concentrações das substâncias vegetais, a serem testadas, sobre o meio de cultura sólido previamente inoculado em placas de Petri com micro-organismos. Os discos são colocados de modo que sua distância até a lateral da placa seja maior que 15 mm, para evitar a sobreposição das zonas de inibição. O pH do meio de cultura deve estar entre 7,2 e 7,4, e a profundidade recomendada é de aproximadamente 4 mm. Após o tempo adequado de incubação, mede-se o diâmetro ou o halo de inibição, área clara onde não houve o crescimento microbiano ao redor da substância em pesquisa (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003; OSTROSKY *et al.*, 2008).

Na técnica de difusão com cilindros de aço inoxidável, após o preparo das placas de Petri com o meio de cultura, com uma espessura de 3 mm de profundidade, solidificado com o micro-organismo a ser testado, são inseridos cilindros de aço inoxidável estéreis, de dimensões 10 mm de altura e 6 mm de diâmetro. As substâncias vegetais em diferentes concentrações são adicionadas aos cilindros. Após incubação, a inibição do crescimento é medida, com auxílio de paquímetro pela formação de halos, expressos em mm (DUTRA *et al.*, 2009).

Na técnica de perfuração em ágar o meio de cultura sólido é removido com o auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas. Decorrido o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição do desenvolvimento são mensurados, em milímetros, da borda do poço ao início do desenvolvimento (MACEDO-COSTA *et al.*, 2009).

Os testes de difusão apresentam várias fontes de erros, tais como composição do meio de cultura, preparação incorreta do meio de cultura, espessura do meio de cultura, densidade incorreta do inóculo, uso de swab com excesso de caldo para inoculação das placas, temperatura e tempo de incubação inadequado, interações entre o antimicrobiano e o meio de cultura, erros na medida das zonas de inibição ou uso de culturas mistas ou contaminadas (ALVES *et al.*, 2008).

2.7.2 Métodos de diluição

O método de diluição é usado para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um micro-organismo. O método é quantitativo, e pode ser realizado pelas técnicas de diluição em caldo ou em ágar. Os agentes antimicrobianos são testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a concentração inibitória mínima (CIM). As CIMs são excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos, e desta forma, utilizados para julgar o desempenho de todos os outros métodos de susceptibilidade (ANDREWS, 2001; ALVES *et al.*, 2008).

As amostras estudadas podem ser tanto solúveis em água, quanto lipossolúveis. O método tem como desvantagem o excessivo trabalho que envolve sua realização, o consumo de material, a coloração dos extratos, a dificuldade na detecção da contaminação com materiais clínicos, a sensibilidade do organismo, o diluente utilizado, o estágio e a taxa de crescimento microbiano (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003; ALVES *et al.*, 2008; OSTROSKY *et al.*, 2008).

A avaliação é comparada frente a um agente antimicrobiano de referência, e como controle negativo o meio de cultura com o solvente usado no preparo das amostras (OSTROSKY *et al.*, 2008).

O método de diluição em caldo ou em ágar pode ser feito de duas maneiras, a primeira é a macrodiluição, que utiliza vários tubos de ensaio, com volumes de meio de cultura variando entre 1 e 10 mL. As desvantagens consistem em ser um método bastante trabalhoso, consumir muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e gerar grande quantidade de resíduos (ALVES *et al.*, 2008; OSTROSKY *et al.*, 2008).

A segunda é a microdiluição que utiliza microplacas estéreis de 80, 96 ou mais cavidades, de fundo redondo ou cônico, com volumes de meio de cultura variando entre 0,1 e 0,2 mL. Apresenta várias vantagens, como baixo custo, alta reprodutibilidade, necessita pouca quantidade de amostra e pode ser usado para testar numerosas amostras. A maior desvantagem está na dificuldade da visualização do resultado, devido a alguns micro-organismos aderir à base da

cavidade, enquanto outros permanecem em suspensão e, também em decorrência da coloração verde da clorofila presente nas amostras (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Os inóculos devem ser ajustados a uma concentração final de 10^4 UFC/mL nos tubos ou nas cavidades da placa. Após incubação, *overnight* a 35°C, os testes são examinados e determina-se a CIM. A CIM pode ser avaliada a olho nu ou através de aparelhos baseados em leitura óptica (ANDREWS, 2001; ALVES *et al.*, 2008).

2.7.3 Métodos bioautográficos

A bioautografia é um método altamente eficaz para detecção de compostos antimicrobianos, pois permite a localização da atividade, facilitando o isolamento de constituintes ativos. Esta técnica permite a localização da atividade antimicrobiana diretamente sobre uma placa de cromatografia em que o organismo é aplicado (SULEIMAN *et al.*, 2009).

O método é rápido, barato, de fácil execução, suficientemente sensível para detectar mínimas quantidades de substâncias antimicrobianas e, apresentar alta precisão e reprodutibilidade (ROMEIRO, 2001; SULEIMAN *et al.*, 2009).

O método consiste em fundir meio de cultura semi-sólido, adicionando a ele micro-organismos teste e, antes da solidificação, atomizar a superfície de uma placa cromatográfica, na qual foi eluído o extrato ou fração vegetal, incubando-o a seguir. O organismo crescerá em toda a superfície do meio, exceto nos locais onde existir uma mancha correspondente a uma substância com atividade antimicrobiana (ROMEIRO, 2001; BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003; SASAKI, 2008).

Os compostos da planta em estudo durante a incubação ultrapassam o meio por difusão formando zonas claras em torno da substância isolada na corrida cromatográfica, indicando inibição do crescimento microbiano (HAMBURGER; CORDEL, 1987; RAHALISON *et al.*, 1994).

2.7.4 Métodos usados para medir a atividade antimicrobiana de combinações

Devido ao aparecimento de patógenos multirresistentes, a terapia de combinação, usando dois ou mais agentes antimicrobianos tornou-se comum. Algumas das metodologias *in vitro* utilizadas para avaliar as interações medicamentosas são: a técnica *Checkerboard*, *Time-kill* e *Etest* (PETERSON *et al.*, 2006).

2.7.4.1 Método *Checkerboard*

O método *Checkerboard* é uma técnica usada para medir *in vitro* a atividade antimicrobiana de combinações de agentes antimicrobianos. As vantagens do método são várias (a) fácil entendimento, (b) a interpretação e os cálculos matemáticos são simples, (c) pode ser utilizada em sistemas de microdiluição, e (d) é uma técnica frequentemente usada em estudos de sinergismo. No entanto, este método também apresenta algumas limitações importantes, (a) o método parece ser menos útil na detecção de alterações na tolerância antimicrobiana ao longo do tempo e pode falhar na detecção de mudanças nos pontos finais de susceptibilidade que permite interpretações de sinergia e antagonismo, (b) os resultados são medidas relativas e, (c) não oferece detalhes sobre a farmacodinâmica das combinações (MUKHERJEE *et al.*, 2005).

O termo *Checkerboard* refere-se a múltiplas diluições com dois antimicrobianos testados em concentrações equivalentes, abaixo ou acima das concentrações inibitórias mínimas para os micro-organismos testados. As concentrações testadas para cada antimicrobiano são de quatro ou cinco diluições abaixo da CIM, usando dois quarto de diluições de cada antimicrobiano. O *Checkerboard* consiste de colunas contendo alguma quantidade da droga A, diluídas ao longo do eixo-x, e linhas contendo a droga B diluídas ao longo do eixo-y (LORIAN, 1991).

A determinação da CIM pelo método *Checkerboard* é frequentemente seguida por uma análise adicional, utilizando o índice não paramétrico de

concentração inibitória fracional (FICI), ou o modelo de resposta de superfície totalmente paramétrico (RSM) (MUKHERJEE *et al.*, 2005).

A maioria dos estudos que investigam a eficácia *in vitro* de agentes antimicrobianos interpretam os resultados através da concentração inibitória fracionada (FIC), e é calculada pelos seguintes cálculos: FIC do composto A (FIC_A) = CIM do composto A em combinação/CIM do composto A independente; FIC do composto B (FIC_B) = CIM do composto B em combinação/CIM do composto B independente. A soma dos FICs de dois compostos em combinação é calculada pelo $FIC_A + FIC_B = FICI$. Sinergismo pode ser definido para FICI menor ou igual a 0,5, aditividade com FICI entre 0,5 e 4,0 e antagonismo para FICI maior que 4 (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008; PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010; CHUNG; NAVARATNAM; CHUNG, 2011).

A determinação do FICI é o método de escolha para análise de interações fármaco-fármaco pelos laboratórios clínicos, pela facilidade de uso, simplicidade e viabilidade em seu desempenho. No entanto, este método apresenta algumas das seguintes desvantagens, (a) é dependente da determinação das CIMs, portanto pode levar a erros interexperimentais, (b) não faz distinção de que em algumas concentrações no *Checkerboard* podem ocorrer sinergia e em outras podem existir indiferença ou antagonismo, (c) em algumas combinações de antimicrobianos, a escolha do ponto final do CIM não é clara, levando a dificuldades no cálculo do FICI, (d) não é passível de análises estatísticas, e (e) a definição de FICI varia muito entre os diferentes estudos (MUKHERJEE *et al.*, 2005).

O método RSM se baseia no cálculo de interação do coeficiente alfa (IC). Os parâmetros são calculados usando a seguinte equação:

$$1 = \frac{D_A}{IC_{50, A} \left[\frac{E}{E_{max} - E} \right]^{1/m_A}} + \frac{D_B}{IC_{50, A} \left[\frac{E}{E_{max} - E} \right]^{1/m_B}} + IC_\alpha \frac{D_A D_B}{IC_{50, A} IC_{50, B} \left[\frac{E}{E_{max} - E} \right]^{0,5 (1/m_A + 1/m_B)}}$$

onde D_A e D_B representam as CIMs das drogas A e B respectivamente, IC_α é o coeficiente de interação, IC_{50} , representa a concentração da droga resultante de 50% de inibição, m_A e m_B são os parâmetros de inclinação para fármacos A e B, E é a resposta medida (densidade óptica) e E_{max} é o controle de resposta. Interações com $IC_\alpha > 0$ indicam sinergismo, $IC_\alpha = 0$ aditividade e $IC_\alpha < 0$ indicam antagonismo. Este método apresenta algumas desvantagens importantes: (a) envolve complicado cálculo matemático de dados de ajuste e etapas de modelagem, (b) os softwares especializados não são acessíveis aos laboratórios clínicos, (c) o modelo se baseia na análise de regressão com base no ajuste de dados, os resultados gerados são dependentes de fatores como os parâmetros iniciais, cálculos como a soma dos quadrados, variância e parâmetros de ponderação e, (4) podendo dar resultados errados (GRECO; BRAVO; PARSONS, 1995; MUKHERJEE *et al.*, 2005).

A complexidade do método RSM o torna menos atrativo como método primário para avaliar as interações entre os agentes antimicrobianos, em combinação, e o método FICI é o método de escolha para a maioria dos estudos (MUKHERJEE *et al.*, 2005).

2.7.4.2 Método *Time-kill*

O método *Time-kill* ou curva de mortalidade é usado principalmente para o estudo de novos antibióticos e para determinar a sinergia/antagonismo da

combinação de duas ou mais substâncias administradas concomitantemente. A curva de mortalidade é uma ferramenta para a determinação dos efeitos antimicrobianos em bactérias, fornecendo informações sobre a dinâmica da atividade bactericida e a relação entre a concentração de sua atividade microbicida (RAMIREZ; CASTAÑO, 2009).

O método é capaz de detectar diferenças nas atividades antimicrobianas ao longo do tempo. Neste método as suspensões de micro-organismos são expostas a diferentes intervalos de tempo. Após os tempos de tratamentos, os micro-organismos são recuperados, plaqueados em meio ágar e incubados para permitir o crescimento. As unidades formadoras de colônias (UFC) para cada ponto de tempo de incubação por mililitro é determinada e representada graficamente como uma função do tempo resultando em curvas de sobrevivência para cada combinação de droga testada. O experimento é feito com inóculo final entre 10^5 e 10^7 UFC/mL a partir da diluição de bactérias de uma cultura, *overnight* em ágar Muller-Hinton, ajustadas ao tubo 0.5 da escala McFarland (LORIAN, 1991).

O método é empregado para testar atividade bactericida dos agentes antimicrobianos e para determinar a eficácia de agentes antimicrobianos, tanto individualmente como em combinação. Para interações antimicrobianas os seguintes critérios são empregados: (a) sinergia é definida com valores abaixo de $\geq 2 \log_{10}$ UFC por mililitro comparado ao agente mais ativo, (b) antagonismo é definido com valores acima de $\geq 2 \log_{10}$ UFC por mililitro comparado ao agente menos ativo, (c) aditividade é definida com valores entre <2 e $1 > \log_{10}$ UFC por mililitro comparado ao agente mais ativo e, (d) indiferença é definida com valores entre <2 e $1 > \log_{10}$ UFC por mililitro comparada ao agente menos ativo (MUKHERJEE *et al.*, 2005).

O ensaio proporciona cinéticas de crescimento ao longo do tempo e resultados mais detalhados dos efeitos das combinações de fármacos sobre a viabilidade microbiana, mas apresenta algumas desvantagens. No método *Time-kill* a dependência dos cálculos de UFCs, que avaliam o crescimento individual dos micro-organismos em suspensão, funciona bem para as bactérias, porém para os fungos, os filamentos tendem a se agregar, o que torna difícil avaliar a inibição (MUKHERJEE *et al.*, 2005).

2.7.4.3 *Etest* (*Epsilonometer strip test*)

O método é utilizado para determinar a eficácia de agentes antimicrobianos e determinar a atividade de combinações destes agentes. Três diferentes métodos têm sido descritos para executar a metodologia de sinergia em combinações de drogas que utilizam tiras *Etest*. Em todos os testes o CIM da droga A e droga A-B são identificados separadamente. No primeiro método a tira de *Etest* contendo a droga A é colocado no ágar semeado com o micro-organismo em estudo. A área correspondente ao seu valor de CIM é marcada sobre a superfície do ágar com auxílio de uma agulha. Após uma hora de incubação a tira é removida e é então colocada a tira com a droga B exatamente no mesmo local da tira anterior, de modo que o CIM da droga B coincida com a marca na superfície do ágar. O segundo método consiste na colocação das duas tiras de *Etest* num ângulo de 90°, de tal forma que as tiras se intersectam nos seus respectivos CIMs e o terceiro método, o fármaco mais ativo é incorporado no meio na concentração especificada e a tira de *Etest* com o segundo medicamento é colocado no meio (BALAJI; JEREMIAH; BALIGA, 2011).

Os resultados obtidos pelo método *Etest* são avaliados de acordo com os seguintes critérios: (a) a sinergia é definida como uma diminuição de ≥ 3 diluições do resultado da CIM, (b) aditividade é a diminuição de ≥ 2 , mas < 3 diluições, (c) indiferença como uma redução de < 2 diluições da CIM e, (d) antagonismo é definido com um aumento de ≥ 3 diluições da CIM para a combinação de antimicrobianos. Trata-se de um método de simples execução, porém os resultados apresentam fraca correlação com o método *Checkerboard* (LEWIS *et al.*, 2002; MUKHERJEE *et al.*, 2005).

2.8 TERAPIA COMBINADA

O aparecimento de patógenos bacterianos resistentes aos antibióticos disponíveis vem aumentando nas últimas décadas. Porém, de maneira contrária ocorreu uma redução no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e a

terapia de combinação antimicrobiana tornou-se uma alternativa para o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias multirresistentes. Esta terapia é benéfica proporcionando uma melhor eficácia, fornecendo um largo espectro de cobertura e prevenindo o surgimento de mutantes (DRAGO *et al.*, 2007; MITSUGUI *et al.*, 2008).

A interação medicamentosa é a interferência de um fármaco na ação de outro, ou de um nutriente ou alimento na ação de medicamentos quando administrados concomitantemente. A combinação de dois fármacos pode produzir interações sinérgicas ou antagônicas (AIYEGORO *et al.*, 2011).

As interações podem ser classificadas de acordo com mecanismos, através dos quais os fármacos interagem um com os outros. Interações físico-químicas quando dois ou mais fármacos interagem exclusivamente através de mecanismos físico-químicos, interação farmacodinâmica quando existe uma adição ou antagonismo ao efeito do fármaco e interação farmacocinética quando um fármaco atua modificando a absorção, distribuição, biotransformação e eliminação de outro fármaco (CORDEIRO; CHUNG; SACRAMENTO, 2005; LIMA; CASSIANI, 2009).

As interações medicamentosas benéficas apresentam como objetivo tratar doenças concomitantes, reduzir efeitos adversos, prolongar a duração do efeito, impedir, ou retardar o surgimento de resistência bacteriana, aumentar a adesão ao tratamento, incrementar a eficácia ou permitir a redução da dose (CORDEIRO; CHUNG; SACRAMENTO, 2005).

As plantas contêm uma diversidade de micromoléculas especializadas, muitas delas com propriedades antibacterianas, com alta probabilidade de causar interações, podendo ser de grande significado em tratamentos terapêuticos. Estudos de avaliação da atividade antimicrobiana de derivados vegetais e sinergismo com fármacos antimicrobianos convencionais representam uma nova estratégia para tratamento de infecções, possibilitando o aumento da eficácia do agente antimicrobiano (BIAVATTI, 2009; COUTINHO *et al.*, 2009; GONZÁLEZ-LAMOTHE *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2009).

Três estratégias de terapia de combinação podem ser definidas. A estratégia mais comum utiliza a combinação de fármacos para inibir diferentes mecanismos da célula bacteriana, a segunda baseia-se na inibição de diferentes alvos na mesma via do metabolismo e a terceira estratégia requer a inibição do mesmo alvo de diferentes maneiras. A atividade sinérgica antibacteriana entre vários compostos

derivados de plantas aumenta os efeitos do extrato de plantas, em comparação com os compostos isolados (WOLSKA; GRZEŚ; KUREK, 2012).

Pesquisadores demonstraram que as plantas com compostos antimicrobianos podem agir com sinergia com antibióticos ou compostos que não possuem atividade antibacteriana intrínseca, e são capazes de sensibilizar o patógeno a um antibiótico previamente ineficaz (AIYEGORO *et al.*, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO

Ramos foliares de *Eugenia pyriformis* Cambess. foram coletados em campo limpo e em borda de capão no Jardim Botânico de Curitiba, nas coordenadas aproximadas de 25° 26' S e 49° 14' W, e na altitude de 930 m, no mês de junho. A identificação da planta foi realizada pelo botânico Gert Hatschbach, no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba – PR, onde uma exsicata está depositada com o registro número MBM 204990 (Figura 3).

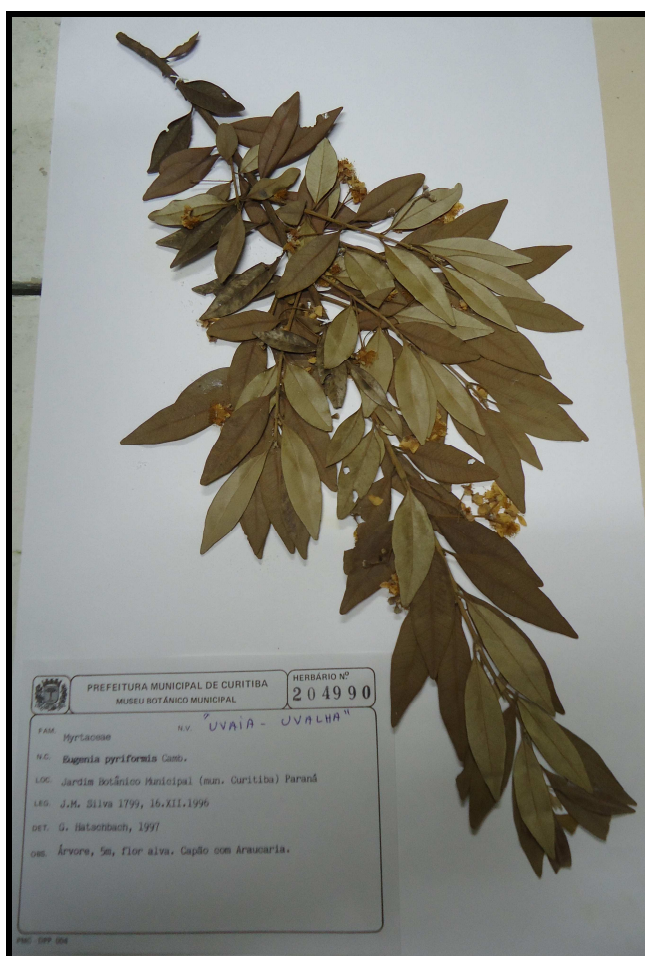


FIGURA 3 - EXCICATA *E. pyriformis* (MBM 204990)

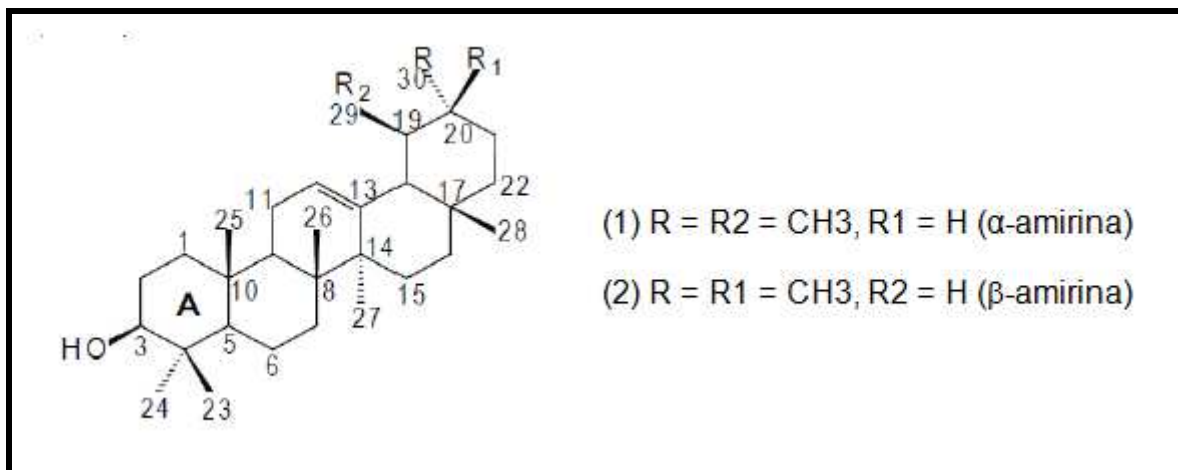
FONTE: O autor (2013)

Trata-se de um trabalho sob testes *in vitro* dos extratos, frações e compostos isolados obtidos a partir da dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, de Lorene Armstrong sob título Estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule de *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae.

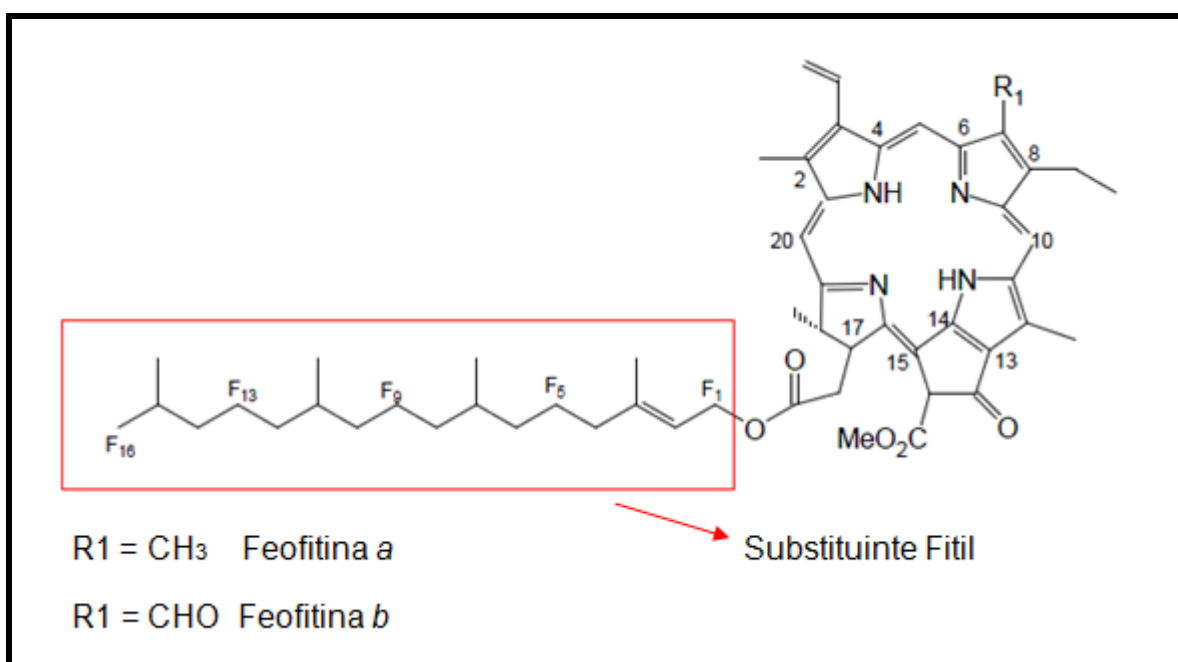
O extrato etanólico bruto foi preparado com etanol a 96° GL, em refluxo contínuo por 6 horas, a 50 °C em aparelho de Soxhlet modificado. As frações foram obtidas pelo método de partição líquido-líquido. Na técnica foram utilizados solventes de padrão analítico PA, em ordem crescente de polaridade (hexano, clorofórmio e acetato de etila), sendo a fração remanescente à hidroalcoólica (CARVALHO, 2001).

O extrato acetônico bruto foi obtido a partir de 840 g de folha e 1 kg de caule extraídos com acetona a 30 °C durante um período de 6 horas em aparelho de Soxhlet modificado (CARVALHO, 2001). Os extratos foram evaporados em BM 60 °C e as amostras eluídas separadamente em um sistema de solventes, água, metanol e acetona, em um processo de filtração sobre octadecilsílica (RP-18) da Lichroprep® (25-40 mesh). A fração obtida a partir da água foi descartada, eliminando-se os açúcares de menor importância, e as frações metanólica e acetônica foram posteriormente concentradas em aparelho rotavapor à temperatura de 50 °C (APPENDINO *et al.*, 2008).

Os compostos isolados foram obtidos a partir das frações metanólica e acetônica, através de colunas de sílica-gel 60 (0,063-0,02 mm/ 70-230 mesh), Masherey-Nagel® e alumínio (Aluminium oxide 90 neutral), pH 7 ± 0,5, utilizando como gradientes éter de petróleo e acetato de etila e o monitoramento feito por cromatografia em camada delgada, na qual foram utilizadas placas Masherey-Nagel® 60 F254 (0,25 mm), sendo estas mergulhadas em H₂SO₄ a 5% (v/v) em etanol e posteriormente aquecidas. As manchas foram observadas a olho nu e pelo UV em 360 nm para a diferenciação de compostos que foram reunidos e concentrados em rotavapor (APPENDINO *et al.*, 2008). Foram identificadas em RMN de ¹³C e ¹H três compostos das folhas sendo um da fração metanólica, denominada LA4D (β-amirina) (Figura 4) e dois da fração acetônica, LA6A (feofitina a) e LA7A (feofitina b) (Figura 5), em quantidades suficientes para análise. No caule foram encontrados os mesmos compostos que na folha, mas em quantidades insignificantes.

FIGURA 4 - β -AMIRINA

FONTE: ARMSTRONG (2011)

FIGURA 5 - FEOFITINA *a* E *b*

FONTE: ARMSTRONG (2011)

Para a análise microbiológica os extratos e frações foram preparados em etanol 10% e DMSO 2%, e filtrados através de membrana milipore 0,22 μm (TPP, Trasadingen, Suíça) para garantir sua esterilidade.

A referida pesquisa possui Depósito de pedido de patente ou de Certificação de adição sob número BR1020120152452, na data de 20 de junho de 2012 (Anexo).

3.2 MICRO-ORGANISMOS

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados com as seguintes cepas: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 40175, *Candida krusei* ATCC 40147 e *Candida parapsilosis* ATCC 40038.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA TÉCNICA DA BIOAUTOGRAFIA

Em câmara de fluxo laminar, foram aplicados 10 µL dos extratos e frações do caule e da folha e os compostos isolados sobre placas de Silicagel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Alemanha) de dimensões 2,5 x 5,0 cm. As placas foram submetidas aos sistemas eluentes acetato de etila, acetona e água (25:8:2) e tolueno e acetona (97:3), acondicionadas em placas de Petri estéreis e secas em estufa a 37 °C por 48 horas, para eliminação dos resíduos de solventes.

As suspensões bacterianas e fúngicas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0.5 de McFarland.

Os meios foram preparados com 0,2 mL do revelador Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio (TTC – Merck, Darmstadt, Alemanha) a 1%, 0,2 mL das suspensões bacterianas ou fúngicas e 20 mL de meio ágar Mueller-Hinton (Merck, Darmstadt, Alemanha) para avaliar a atividade antibacteriana e ágar Sabouraud dextrose (Merck, Darmstadt, Alemanha) para a avaliação da atividade antifúngica, a uma temperatura de 35 °C, previamente preparado e esterilizado (CUNICO, 2007; DIAS, 2012).

Os meios foram vertidos sobre as cromatoplas contidas nas placas de Petri, incubadas a 37 °C por 16 a 20 horas para a atividade antibacteriana e 48 horas para a atividade antifúngica e realizada a leitura dos resultados. Como controle negativo foram incubadas placas corridas em branco, sem amostra. Para o

controle de esterilidade do meio e das placas foi incubada uma cromatoplaça sem o inóculo e para o controle positivo do crescimento microbiano foram preparados discos de Vancomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e Fluconazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

As substâncias cromatograficamente separadas que exibiram atividade antimicrobiana foram reconhecidas nos bioautogramas por meio da formação de halos ou zonas de inibição ao redor de suas bandas. As áreas de inibição foram marcadas e os valores do Índice de Retenção (R_f) foram calculados, através da razão entre a distância percorrida pela substância em estudo e a distância percorrida pelo sistema eluente. O teste foi realizado em duplicata (ROMEIRO, 2001).

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PELA TÉCNICA DA MICRODILUIÇÃO

3.4.1 Atividade antibacteriana

Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram determinados pela técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2008). Os extratos e frações foram preparados através de diluição seriada em 100 μ L de caldo Mueller-Hinton (MHB – Merck, Darmstadt, Alemanha), em um intervalo de concentração de 1000 μ g/mL a 7,81 μ g/mL e os compostos isolados de 200 μ g/mL a 1,56 μ g/mL em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”.

As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0.5 de McFarland e em seguida foram inoculadas em um volume de 5 μ L nos orifícios, permanecendo uma concentração final de 10^4 UFC/mL.

O controle negativo da atividade inibitória dos diluentes, etanol e DMSO, foram realizados adicionando-se 100 μ L de solução de etanol 10% e DMSO 2% em 100 μ L de MHB e 5 μ L dos inóculos bacterianos. Para o controle de esterilidade, foram utilizados 100 μ L de MHB e 100 μ L do extrato, fração ou composto isolado. O

controle positivo ou de viabilidade bacteriana, foi preparado com 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 16 a 20 horas. Decorrido este intervalo de tempo foram acrescidos 20 µL de solução aquosa de TTC a 0,5% e as microplacas foram reincubadas por três horas a 35 °C. Em seguida foi realizada a leitura dos resultados.

3.4.2 Atividade antifúngica

Em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U” foram preparadas diluições seriadas dos extratos e frações em um intervalo de concentração de 1000 µg/mL a 7,81 µg/mL e os compostos isolados de 200 µg/mL a 1,56 µg/mL em meio líquido RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA) (CLSI, 2008). As diferentes suspensões fúngicas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração inicial de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Estas foram diluídas em meio líquido até atingir uma concentração final de $1,0$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL e em seguida inoculados 100 µL nos orifícios. As microplacas foram incubadas por 48 horas a 35 °C. Após este período foram adicionados 20 µL de TTC 0,5% e as placas foram reincubadas por três horas a 35 °C. Em seguida foi realizada a leitura dos resultados.

3.4.3 Interpretação dos resultados

Os valores obtidos das CIMs foram classificados em bom potencial inibitório (até 100 µg/mL); moderada atividade inibitória (entre 100-500 µg/mL); fraca atividade inibitória (entre 500-1000 µg/mL) e inativos (maiores que 1000 µg/mL) (TANAKA *et al.*, 2005; AYRES *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2008). Os compostos isolados foram classificados como inativos para valores de CIM maiores que 100 µg/mL.

3.5 DETERMINAÇÃO DAS CIMs DOS ANTIMICROBIANOS

As CIMs da Vancomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e Fluconazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram determinados através da técnica da microdiluição em caldo. A seleção dos antimicrobianos foi baseada no CLSI (2008).

A Vancomicina foi preparada através de diluição seriada em 100 µL de caldo MHB, em um intervalo de concentração de 32 µg/mL a 0,015 µg/mL em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de "U" (CLSI, 2008). As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0.5 de McFarland, e em seguida foram inoculadas em um volume de 5 µL nos orifícios, permanecendo uma concentração final de 10^4 UFC/mL. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 16 a 20 horas. Decorrido este intervalo de tempo foram acrescidos 20 µL de solução aquosa de TTC a 0,5% e as microplacas foram reincubadas por três horas a 35 °C. Em seguida foi realizada a leitura dos resultados.

O Fluconazol foi preparado através de diluições seriadas em um intervalo de concentração de 512 µg/mL a 0,25 µg/mL em meio líquido RPMI 1640 (CLSI, 2008). As suspensões fúngicas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração inicial de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Estas foram diluídas em meio líquido até atingir uma concentração final de $1,0$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL e em seguida inoculados 100 µL nos orifícios. As microplacas foram incubadas por 48 horas a 35 °C. Após este período foram adicionados 20 µL de TTC 0,5% e as placas foram reincubadas por três horas a 35 °C. Em seguida foi realizada a leitura dos resultados.

Para validação da técnica e controle metodológico foi verificado se as linhagens referência utilizadas estavam dentro do intervalo de confiança estipulado pelo CLSI (2008). Ou seja, quando testada Vancomicina para *S. aureus* entre 0,5 e 2,0 µg/mL e para *E. faecalis* entre 1 e 4 µg/mL. Quando avaliado o Fluconazol para *C. albicans* entre 0,25 e 1,0 µg/mL, para *C. parapsilosis* entre 1,0 e 4,0 µg/mL e *C. krusei* entre 16 e 128 µg/mL.

3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO PELA TÉCNICA *CHECKERBOARD*

Neste estudo foi avaliada a atividade antibacteriana das associações entre os extratos e frações de *E. pyriformis* e o antibiótico Vancomicina sobre cepas de *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 25923 e a atividade antifúngica das associações entre os extratos e frações de *E. pyriformis* e o antifúngico Fluconazol sobre cepas de *C. albicans* ATCC 40175, *C. krusei* ATCC 40174 e *C. parapsilosis* ATCC 40038 utilizando a técnica *Checkerboard* para derivação do índice de concentração inibitória fracionada (FICI).

A avaliação do potencial sinérgico foi realizada com os extratos e frações de *E. pyriformis* que apresentaram valores de CIM inferiores a 100 µg/mL frente aos micro-organismos testados. Amostras com CIM acima de 100 µg/mL, não apresentam interesse para uso clínico (MITSCHER *et al.*, 1972).

Os extratos e frações de *E. pyriformis* e os antimicrobianos em associação são testados nas concentrações CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4, CIMx8.

3.6.1 Atividade antibacteriana

Os extratos e frações de *E. pyriformis* e a Vancomicina foram preparados a partir de suas respectivas CIMs. Inicialmente, 100 µL de caldo MHB foram adicionados nos orifícios das microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de "U" (CLSI, 2008). Em seguida, 50 µL de cada amostra testada, em diversas concentrações (CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4, CIMx8), foram adicionadas no sentido vertical da microplaca e 50 µL da Vancomicina, em diversas concentrações (CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4, CIMx8) no sentido horizontal da microplaca.

As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, equivalente ao tubo 0.5 de McFarland e em seguida foram inoculadas em um volume de 10 µL nos orifícios, permanecendo uma concentração final de 10^4 UFC/mL.

O controle negativo da atividade inibitória dos diluentes, etanol e DMSO, foram realizados adicionando-se 100 µL de solução de etanol 10% e DMSO 2% em 100 µL de MHB e 10 µL dos inóculos bacterianos. Para o controle de esterilidade, foram utilizados 100 µL de MHB e 100 µL do extrato ou fração. O controle positivo ou de viabilidade bacteriana, foi preparado com 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 16 a 20 horas. Decorrido este intervalo de tempo foram acrescidos 20 µL de solução aquosa de TTC a 0,5% e as microplacas foram reincubadas por três horas a 35 °C. Em seguida foi realizada a leitura dos resultados.

3.6.2 Atividade antifúngica

Em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U” (CLSI, 2008) foram adicionados 50 µL de cada amostra testada, em diversas concentrações (CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4, CIMx8) no sentido vertical da microplaca e 50 µL do Fluconazol, em diversas concentrações (CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4, CIMx8) no sentido horizontal da microplaca. As diferentes suspensões fúngicas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração inicial de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Estas foram diluídas em meio líquido RPMI 1640 até atingir uma concentração final de $1,0$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL e em seguida inoculados 100 µL nos orifícios. As microplacas foram incubadas por 48 horas a 35 °C. Após este período foram adicionados 20 µL de TTC 0,5% e as placas foram reincubadas por três horas a 35 °C. Em seguida foi realizada a leitura dos resultados. Os ensaios são realizados em duplicata.

3.6.3 Análise dos resultados

A análise das associações de *E. pyriformis* com os antimicrobianos é obtida através do cálculo do FICI. O FICI é soma do $FIC_A + FIC_B$, onde A, representa os

extratos e frações de *E. pyriformis* e B a Vancomicina ou o Fluconazol. O FIC_A é calculado através da relação CIM_A em combinação/ CIM_A independente, enquanto que o FIC_B é a CIM_B em combinação/ CIM_B independente.

Para análise dos resultados, os FICIs foram calculados com as CIMs mais efetivas obtidas nas amostras combinadas, e foram interpretados como sinergismo ($\leq 0,5$); aditividade (entre 0,5 e 4,0) ou antagonismo ($> 4,0$) (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008; PALANIAPPAN, HOLLEY, 2010; CHUNG; NAVARATNAM; CHUNG, 2011).

3.6.4 Construção do isoblograma

Para caracterizar a natureza das interações entre as várias associações de extratos e frações de *E. pyriformis* com a Vancomicina e o Fluconazol quando aplicadas sobre cepas-padrão, foram construídos gráficos do tipo isoblograma, utilizando as associações $CIM/8$, $CIM/4$, $CIM/2$, CIM , $CIM \times 2$, $CIM \times 4$ de *E. pyriformis*-Vancomicina e *E. pyriformis*-Fluconazol, nas quais não foi verificado crescimento microbiano pela técnica *Checkerboard*.

O isoblograma é interpretado examinando os pontos das proporções em que o CIM para cada concentração é determinado em relação ao CIM independente, calculando seus respectivos FIC (ROSATO *et al.*, 2007). Os valores de FIC foram plotados em um isoblograma, permitindo a representação gráfica das interações resultantes em várias associações.

Para análise dos resultados, foram traçadas linhas entre os índices FIC, discriminando visualmente as interações classificadas com atividade de sinergismo ($\leq 0,5$); aditividade (entre 0,5 e 4,0) e antagonismo ($> 4,0$) (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008; PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010; CHUNG; NAVARATNAM; CHUNG, 2011).

3.7 LEITURA DOS RESULTADOS

A formação da coloração vermelha nos orifícios das microplacas, observada nas técnicas da Microdiluição em caldo e *Checkerbord*, foi interpretada como ausência da atividade antimicrobiana pela substância em estudo, enquanto que a não formação da coloração vermelha foi considerada como presença de atividade. A CIM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano (ou seja, a ausência da coloração vermelha no orifício). Cada teste foi realizado em duplicata e a CIM final foi determinada de acordo com a média aritmética dos resultados obtidos.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi feita por meio de metodologia estatística descritiva, utilizando o programa Excel como banco de dados dos resultados.

Para a construção dos isobogramas foi utilizado o programa GraphPadPrism® Versão 6.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA TÉCNICA DA BIOAUTOGRAFIA

Os resultados obtidos pela técnica da bioautografia estão representados na Tabela 2 e alguns exemplos podem ser vistos na Figura 6.

A bioautografia permite a detecção de halos de inibição que revelam a presença de substâncias ativas na cromatografia de camada delgada (SARAIVA *et al.*, 2012).

Para a realização da cromatografia em camada delgada (CCD), alguns sistemas eluentes foram testados para a obtenção de um cromatograma de boa qualidade, pois a separação inadequada dos extratos e frações de *E. pyriformis* pode interferir no resultado da atividade antimicrobiana. Dentre os sistemas testados, os que apresentaram melhores resultados foram os sistemas acetato de etila, acetona e água (25:8:2) e tolueno e acetona (97:3), justificando seu uso neste ensaio.

TABELA 2 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DO CAULE E FOLHAS DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS. PELA TÉCNICA DA BIOAUTOGRAFIA

Micro-organismo	Extratos e Frações Caule						Extratos e Frações Folha						Compostos Isolados		
	EB	FHE	FC	FAE	FH	EA	EB	FHE	FC	FAE	FH	EA	LA4D	LA6A	LA7A
Gram-positivo															
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Gram-negativo															
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Fungos leveduriformes															
<i>C. albicans</i> ATCC 40175	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>C. krusei</i> ATCC 40174	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 40038	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-

FONTE: O autor (2012)

NOTA: **(EB)** Extrato Bruto, **(FHE)** Fração Hexano, **(FC)** Fração Clorofórmio, **(FAE)** Fração Acetato de Etila, **(FH)** Fração Hidroalcoólica, **(EA)** Extrato Acetônico, **(LA4D)** β-amirina, **(LA6A)** Feofitina a, **(LA7A)** Feofitina b, **(+)** Presença de inibição do crescimento, **(-)** Ausência de inibição do crescimento.

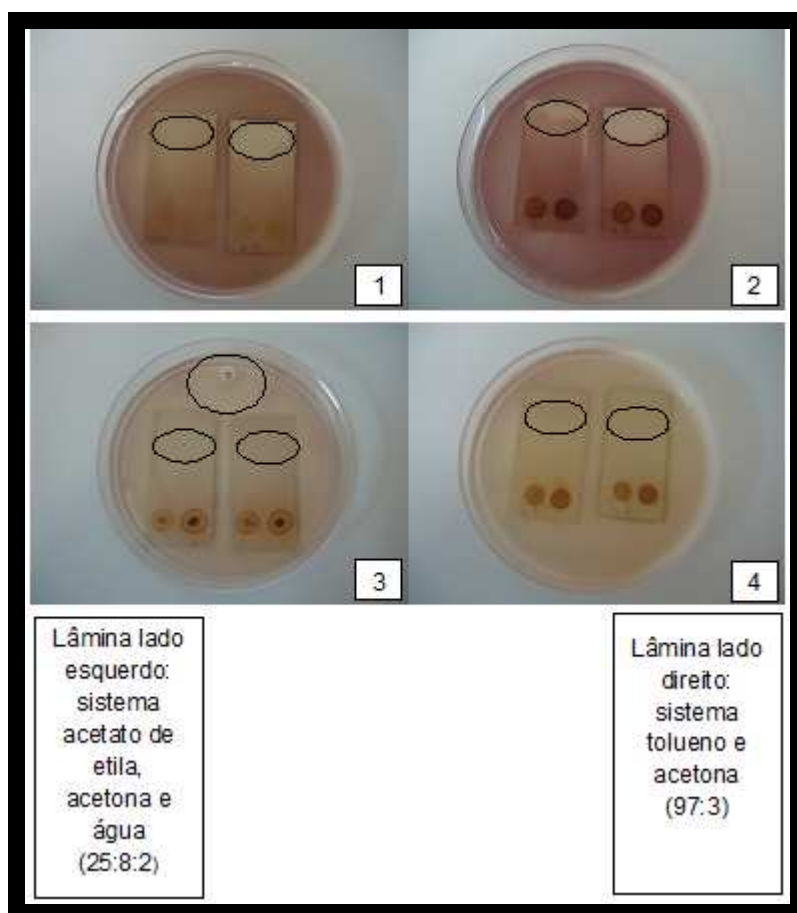


FIGURA 6 - ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *E. pyriformis* PELA TÉCNICA DA BIOAUTOGRAFIA

FONTE: O autor (2012)

NOTA: (1) Fração Clorofórmio de Caule e de Folha com *E. faecalis* ATCC 29212, (2) Extrato Acetônico de Caule e de Folha com *E. faecalis* ATCC 29212, (3) Extrato Bruto de Caule, de Folha e disco de Vancomicina com *S. aureus* ATCC 25923 e (4) Extrato Acetônico de Caule e de Folha com *S. aureus* ATCC 25923.

Áreas circundadas em negrito: Halos de inibição de crescimento

O teste da bioautografia permitiu detectar atividade antimicrobiana nos extratos, frações e compostos isolados de *E. pyriformis* frente a cepas de micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos leveduriformes. Neste ensaio foi observada somente uma zona de inibição de crescimento microbiano nos bioautogramas das amostras que apresentaram atividade antimicrobiana. As inibições de crescimento foram observadas em R_f 0,77. Os cromatogramas obtidos a partir do sistema acetato de etila, acetona e água (25:8:2) e tolueno e acetona (97:3) formaram halos de inibição de crescimento semelhante para todos os micro-organismos.

Na Tabela 2 observa-se que o extrato bruto, tanto para caule como para folha, foi efetivo para todos os micro-organismos testados. Ao avaliar as frações pode-se observar que todos possuem atividade sobre algum micro-organismo e ao se avaliar os compostos isolados pode-se perceber que todos possuem atividade sobre *E. faecalis* mas não sobre os demais micro-organismos testados. Os resultados encontrados nos remetem ao isolamento e identificação de novos compostos a fim de identificar quem são os ativos responsáveis pela atividade antimicrobiana observada.

Apesar da técnica da determinação da CIM ser apresentada no item 4.2, a técnica da bioautografia revelou amostras com presença de atividade inibitória que contrastaram com os resultados obtidos na determinação da CIM. Os resultados obtidos pela técnica da bioautografia mostraram halos de inibição de crescimento em todas as amostras de extratos, frações e compostos isolados de *E. pyrifomis* contra os micro-organismos Gram-positivos testados. Para as frações hexano e clorofórmio de caule e a fração hidroalcoólica de folha também foram observados halos de inibição contra *C. albicans*. Estes extratos e frações não apresentaram atividade inibitória na determinação de suas CIMs até concentrações de 1000 µg/mL e para os compostos isolados até 100 µg/mL. Estes resultados sugerem que apesar da bioautografia ser uma técnica qualitativa (SULEIMAN *et al.*, 2009), apresentou maior sensibilidade na detecção de compostos bioativos presentes nas amostras de *E. pyrifomis*.

O ensaio da bioautografia demonstrou ser uma metodologia eficiente e constitui uma ferramenta qualitativa para a pesquisa de compostos antimicrobianos, tanto de extratos de plantas como para substâncias isoladas, como confirmado também com extratos e frações de *Ottonia martiana* estudado por Cunico (2007).

4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A CIM de extratos, frações e compostos isolados de caule e folhas de *E. pyrifomis* Cambess. estão representados na Tabela 3.

TABELA 3 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DO CAULE E FOLHAS DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS.

Micro-organismo	Extratos e Frações Caule (µg/mL)						Extratos e Frações Folha (µg/mL)						Compostos Isolados (µg/mL)		
	EB	FHE	FC	FAE	FH	EA	EB	FHE	FC	FAE	FH	EA	LA4D	LA6A	LA7A
Gram-positivo															
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	250	500	1000	1000	-	62,5	125	-	250	62,5	62,5	62,5	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	250	-	-	-	-	62,5	125	-	250	62,5	62,5	125	-	-	-
Gram-negativo															
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1000	-	-	-	-	250	1000	-	500	250	500	250	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	1000	-	-	-	-	-	1000	-	-	250	-	1000	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1000	-	-	1000	-	1000	1000	-	500	250	1000	500	-	-	-
Fungos leveduriformes															
<i>C. albicans</i> ATCC 40175	31,25	-	-	-	-	7,81	31,25	-	-	62,5	-	7,81	-	-	-
<i>C. krusei</i> ATCC 40174	31,25	-	-	-	-	7,81	7,81	-	-	31,25	-	7,81	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 40038	62,5	-	-	-	-	7,81	15,62	-	-	31,25	-	7,81	-	-	-

FONTE: O autor (2012)

NOTA: **(EB)** Extrato Bruto, **(FHE)** Fração Hexano, **(FC)** Fração Clorofórmio, **(FAE)** Fração Acetato de Etila, **(FH)** Fração Hidroalcoólica, **(EA)** Extrato Acetônico, **(LA4D)** β-amirina, **(LA6A)** Feofitina a, **(LA7A)** Feofitina b, **(-)** CIM superior a 1000 µg/mL para o extrato bruto e frações e CIM superior a 100 µg/mL para os compostos isolados.

Na Tabela 3 pode-se destacar a atividade antimicrobiana do extrato bruto de caule e de folha sobre os micro-organismos testados conforme exemplificado nas Figuras 7 e 8. Os valores de CIMs obtidos neste ensaio microbiológico mostraram que os extratos e frações de *E. pyriformis* causaram inibição de crescimento microbiano frente às cepas testadas.

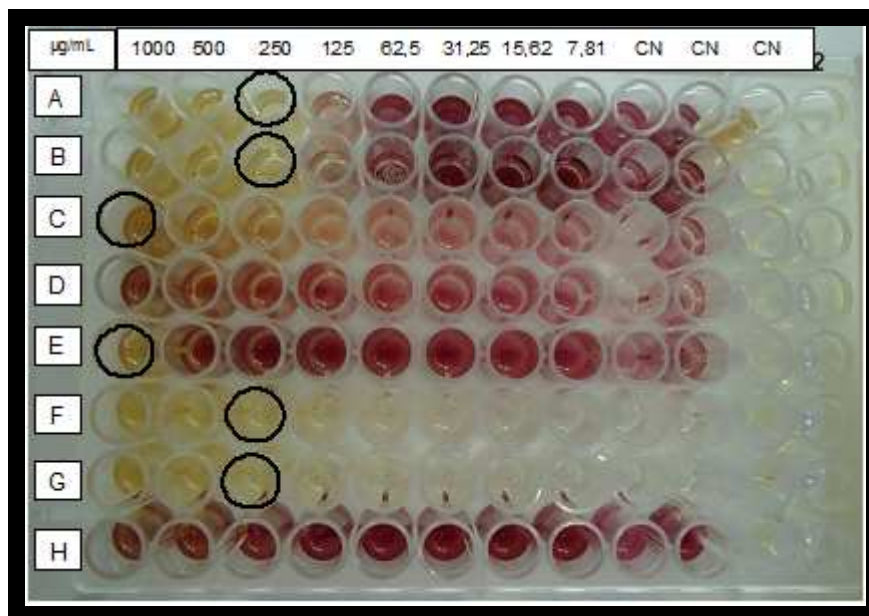


FIGURA 7 - ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO BRUTO DE CAULE DE *E. pyriformis* PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

FONTE: O autor (2012)

NOTA: (A e B) *S. aureus* ATCC 25923, (C e D) *E. coli* ATCC 25922, (E) *P. aeruginosa* ATCC 27853, (F e G) *E. faecalis* ATCC 29212 e (H) *K. pneumoniae* ATCC 700603, (CN) Controle negativo

Áreas circundadas em negrito: CIM

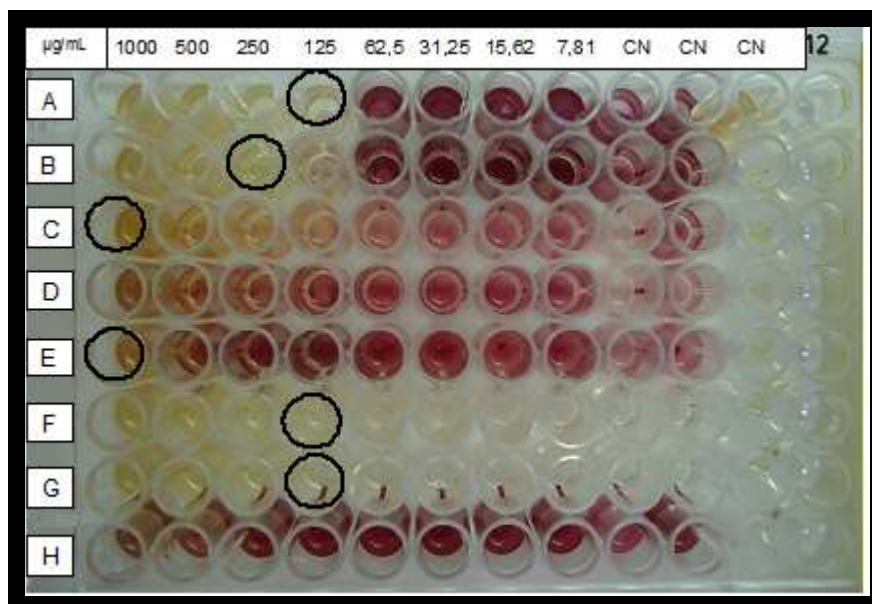


FIGURA 8 - ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO BRUTO DE FOLHA DE *E. pyriformis* PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

FONTE: O autor (2012)

NOTA: (A e B) *S. aureus* ATCC 25923, (C e D) *E. coli* ATCC 25922, (E) *P. aeruginosa* ATCC 27853, (F e G) *E. faecalis* ATCC 29212 e (H) *K. pneumoniae* ATCC 700603, (CN) Controle negativo

Áreas circundadas em negrito: CIM

O gênero *Eugenia* representa um grupo de plantas que apresentam em sua composição compostos bioativos com atividade antimicrobiana, sendo que a espécie *E. pyriformis* não foi a única ser estudada. Estudos realizados com *E. umbelliflora* e *E. brasiliensis* demonstraram atividade antibacteriana para *S. aureus* em seus óleos essenciais (MAGINA *et al.*, 2009) e com *Eugenia obtusifolia* Cambess. (BUSSMANN *et al.*, 2010) e *Eugenia uniflora* (HOLETZ *et al.*, 2002) foi caracterizada atividade inibitória contra *E. coli*.

Estudos fitoquímicos anteriores, realizados por Armstrong (2011) demonstraram a presença de glicosídeos flavônicos e esteróides/triterpenóides particularmente no extrato hidroalcoólico das folhas de *E. pyriformis*. Os compostos flavonóides possuem ação antibacteriana que atuam inibindo a síntese de ácidos nucleicos, alterando a membrana citoplasmática, ou ainda interferindo no metabolismo de energia da bactéria (FOWLER *et al.*, 2011; HENDRA *et al.*, 2011; KUREK *et al.*, 2011). Enquanto que, os compostos terpenóides, por apresentar característica lipofílica, podem causar uma ruptura da membrana bacteriana, porém,

seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido (SALEEM *et al.*, 2009).

Conforme observado na Tabela 3, ao avaliar a atividade antibacteriana dos grupos testados foi observado que a fração do extrato acetônico do caule e da folha, as frações hidroalcoólica e acetato de etila das folhas mostraram um bom potencial inibitório contra os micro-organismos Gram-positivos, porém, ausência de atividade para os Gram-negativos. Alguns pesquisadores sugerem que os compostos terpenóides e seus derivados oxigenados apresentam uma inibição mais efetiva sobre os micro-organismos Gram-positivos que em Gram-negativos (TIWARI *et al.*, 2009), compatíveis com os resultados observados neste estudo.

A reduzida atividade inibitória apresentada nas bactérias Gram-negativas em relação às bactérias Gram-positivas também pode ser decorrente de sua característica estrutural, justificada pela presença de uma membrana externa em torno da parede celular, formando uma barreira de permeabilidade e dificultando a difusão de compostos através de sua camada de lipopolissacárides (CHEW *et al.*, 2011). A ausência desta barreira em bactérias Gram-positivas permite o contato direto de substâncias com a camada de fosfolípídeos da membrana celular permitindo o aumento na permeabilidade iônica e o vazamento de constituintes intracelulares vitais, ou ainda resultando na deficiência de seus sistemas enzimáticos (ALVIANO; ALVIANO, 2009; ZARAI *et al.*, 2011).

Na análise da atividade antifúngica os resultados (Tabela 3) sugerem uma eficiência da atividade de *E. pyrifomis* sobre os fungos leveduriformes (Figura 9 e 10), que apesar de serem organismos eucarióticos, com organização estrutural mais complexa em comparação às bactérias (TEKE *et al.*, 2011), apresentaram valores de CIM mais expressivos.

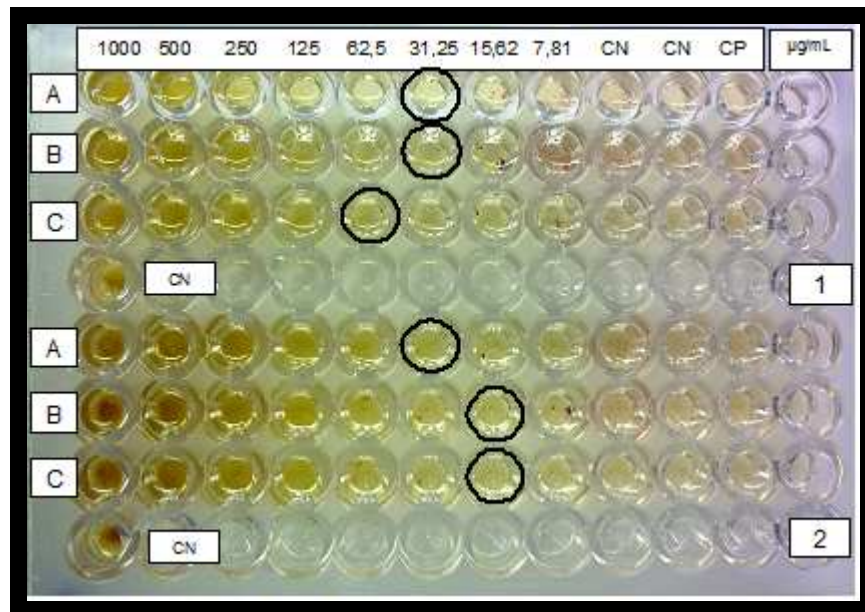


FIGURA 9 - ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATO BRUTO DE *E. pyriformis* PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

FONTE: O autor (2012)

NOTA: (1) Extrato Bruto de Caule, (2) Extrato Bruto de Folha, (A) *Candida albicans* ATCC 40175, (B) *Candida krusei* ATCC 40174, (C) *Candida parapsilosis* ATCC 40038, (CN) Controle negativo, (CP) Controle positivo

Áreas circundadas em negrito: CIM

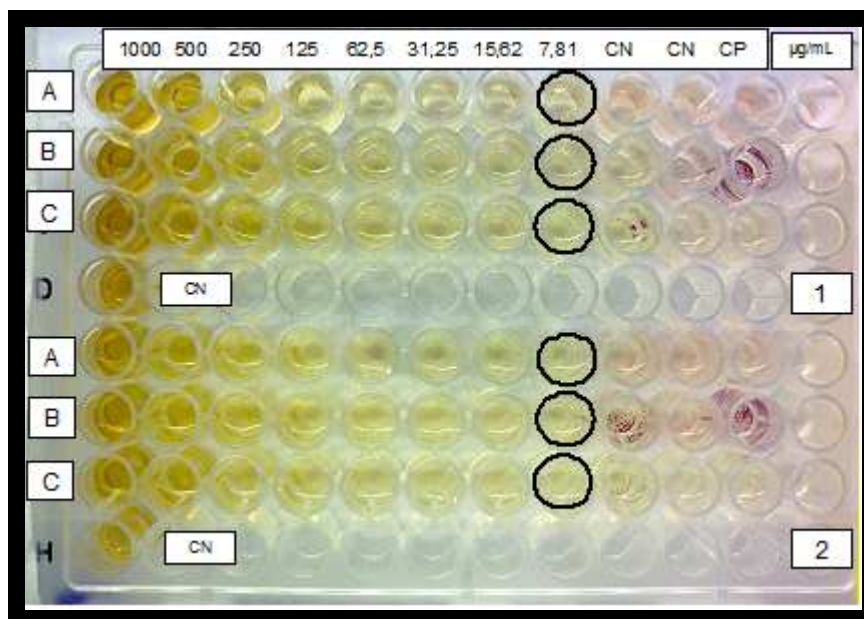


FIGURA 10 - ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATO ACETÔNICO DE *E. pyriformis* PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

FONTE: O autor (2012)

NOTA: (1) Extrato Acetônico de Caule, (2) Extrato Acetônico de Folha, (A) *Candida albicans* ATCC 40175, (B) *Candida krusei* ATCC 40174, (C) *Candida parapsilosis* ATCC 40038, (CN) Controle negativo, (CP) Controle positivo

Áreas circundadas em negrito: CIM

Os compostos isolados LA4D, LA6A e LA7A foram testados até a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, pois segundo Mitscher e colaboradores (1972) amostras com CIM acima de 100 $\mu\text{g/mL}$, não apresentam interesse para uso clínico. Neste estudo os compostos isolados não apresentaram atividade antimicrobiana em concentrações abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$ e foram classificados como inativos.

A ausência de atividade antimicrobiana para os compostos isolados sugere que a atividade de um metabólito secundário pode ser inespecífica, porém a soma de todas as interações dos metabólitos secundários, que possuem mais grupos funcionais e exibem múltiplas bioatividades presentes em misturas complexas, podem levar a um efeito antimicrobiano substancial (WINK, 2003; WINK, 2008).

O presente trabalho demonstrou que os extratos e frações obtidos da planta *Eugenia pyriformis* Cambess. apresentam atividade antimicrobiana, sendo capazes de inibir *in vitro* o crescimento de bactérias e fungos, sendo uma fonte para futuras investigações na descoberta de novos medicamentos com atividade antimicrobiana.

Esses resultados são significativos e podem gerar interesse para a indústria de medicamentos fitoterápicos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO PELA TÉCNICA *CHECKERBOARD*

Os resultados obtidos na avaliação da influência dos extratos e frações de *E. pyriformis* em associação com a Vancomicina contra *E. faecalis* e *S. aureus*, e em associação com o Fluconazol frente a *C.albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* estão representados na Tabela 4 e 5.

TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (FIC) E ÍNDICES FIC PARA OS MICRO-ORGANISMOS GRAM-POSITIVOS

	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212				<i>S. aureus</i> ATCC 25923			
	CIM ₀	CIM _c	FIC	FICI	CIM ₀	CIM _c	FIC	FICI
EA Caule - Vancomicina								
EA Caule (µg/mL)	62,5	>500	>8	>8	62,5	7,81	0,1249	2,1249
Vancomicina (µg/mL)	1	>8	>8		2	4	2	
EA Folha - Vancomicina								
EA Folha (µg/mL)	62,5	500	8	8,125				
Vancomicina (µg/mL)	1	0,125	0,125					
FAE Folha - Vancomicina								
FAE Folha (µg/mL)	62,5	500	8	8,125	62,5	62,5	1	1,25
Vancomicina (µg/mL)	1	0,125	0,125		2	0,5	0,25	
FH Folha - Vancomicina								
FH Folha (µg/mL)	62,5	15,62	0,2499	0,3749	62,5	7,81	0,1249	2,1249
Vancomicina (µg/mL)	1	0,25	0,125		2	4	2	

FONTE: O autor (2013)

NOTA: CIM₀, CIM de amostra independente; CIM_c, CIM mais efetiva da amostra combinadaFIC de *E. pyriformis* = CIM de *E. pyriformis* em combinação com Vancomicina / CIM de *E. pyriformis* independenteFIC de Vancomicina = CIM de Vancomicina em combinação com *E. pyriformis* / CIM de Vancomicina independenteÍndice FIC = FIC de *E. pyriformis* + FIC de Vancomicina

TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (FIC) E ÍNDICES FIC PARA OS FUNGOS LEVEDURIFORMES

	<i>C. albicans</i> ATCC 40175				<i>C. krusei</i> ATCC 40174				<i>C. parapsilosis</i> ATCC 40038			
	CIM ₀	CIM _c	FIC	FICI	CIM ₀	CIM _c	FIC	FICI	CIM ₀	CIM _c	FIC	FICI
EB Caule - Fluconazol												
EB Caule (µg/mL)	31,25	15,62	0,4998	2,4998	31,25	15,62	0,4998	0,6248	62,5	7,81	0,1249	1,1249
Fluconazol (µg/mL)	0,5	1	2		64	8	0,125		4	4	1	
EB Folha - Fluconazol												
EB Folha (µg/mL)	31,25	15,62	0,4998	0,9998	7,81	1,95	0,2496	0,4996	15,62	3,9	0,2496	0,3746
Fluconazol (µg/mL)	0,5	0,25	0,5		64	16	0,25		4	0,5	0,125	
EA Caule - Fluconazol												
EA Caule (µg/mL)	7,81	7,81	1	1,25	7,81	3,9	0,4993	0,6243	7,81	0,97	0,1241	1,1241
Fluconazol (µg/mL)	0,5	0,125	0,25		64	8	0,125		4	4	1	
EA Folha - Fluconazol												
EA Folha (µg/mL)	7,81	3,9	0,4993	0,6243	7,81	0,97	0,1241	0,2491	7,81	3,9	0,4993	0,6243
Fluconazol (µg/mL)	0,5	0,062	0,125		64	8	0,125		4	0,5	0,125	
FAE Folha - Fluconazol												
FAE Folha (µg/mL)	62,5	15,62	0,2499	0,3749	31,25	3,9	0,1248	0,2498	31,25	7,81	0,2499	0,3749
Fluconazol (µg/mL)	0,5	0,062	0,125		64	8	0,125		4	0,5	0,125	

FONTE: O autor (2013)

NOTA: CIM₀, CIM de amostra independente; CIM_c, CIM mais efetiva da amostra combinadaFIC de *E. pyriformis* = CIM de *E. pyriformis* em combinação com Fluconazol / CIM de *E. pyriformis* independenteFIC de Fluconazol = CIM de Fluconazol em combinação com *E. pyriformis* / CIM de Fluconazol independenteÍndice FIC = FIC de *E. pyriformis* + FIC de Fluconazol

Estudos de sinergismo entre produtos naturais e alguns antibióticos tem sido descritas nos últimos anos por vários pesquisadores. Mandalari e colaboradores (2010) estudaram o potencial antimicrobiano dos polifenóis extraídos da pele de amêndoas, demonstrando interações sinérgicas e indiferentes sobre *Samonella enterica* e *Staphylococcus aureus*. Fernandes e colaboradores (2012) observaram efeitos sinérgicos de *Psidium guineense* Swartz em combinação com agentes antimicrobianos sobre cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) e Puhl e colaboradores (2011) verificaram sinergismo com extrato bruto e frações de *Piper gaudichaudianum* Kuntze com antibióticos de diferentes classes (ceftriaxona, vancomicina e tetraciclina). Estes estudos demonstraram que os extratos de plantas não apenas possuem propriedades antibacterianas, mas também possuem a capacidade de interferir na atividade antibiótica, demonstrando efeito sinérgico ou antagônico.

Os antimicrobianos possuem um papel importante no tratamento de doenças infecciosas, no entanto, o aumento da resistência antimicrobiana a muitas destas drogas tem provocado o surgimento de novas doenças e o reaparecimento de outras (CHUNG; NAVARATNAM; CHUNG, 2011). Uma estratégia para minimizar este problema tem sido a utilização combinada de drogas e o estudo de compostos com efeito sinérgico às drogas já existentes (HEMAISWARYA; DOBLE, 2010). Do ponto de vista farmacológico, as substâncias isoladas com ação apenas em um alvo molecular, em geral, são menos eficientes para o tratamento de uma doença, do que a terapia combinada que atua em vários alvos simultaneamente, potencializando o efeito terapêutico (BIAVATTI, 2009).

Cerca de 90-95 % de *Staphylococcus aureus* em todo o mundo são resistentes à penicilina e na maioria dos países asiáticos 70-80% das mesmas estirpes são resistentes à metilina. O considerável progresso da resistência aos antibióticos levou à busca de métodos confiáveis para controlar os *Enterococcus* spp., *S. aureus* resistentes à vancomicina e MRSA (RICE, 2006; HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

Neste trabalho, os efeitos antimicrobianos da interação de *E. pyrifomis* com a Vancomicina frente a *E. faecalis* e *S. aureus* foram avaliados pela CIM mais efetiva de cada amostra combinada e o cálculo de seus respectivos FICIs.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4, a fração hidroalcoólica de folha potencializou a atividade da Vancomicina sobre *E. faecalis* com um valor de FICI de 0,3749 e sua atividade mostrou uma redução da CIM da Vancomicina em 8 vezes. Porém, as demais amostras testadas mostraram efeito antagônico contra *E. faecalis* com valores de FICI superiores a 8,0. Nestas amostras houve aumento da CIM da Vancomicina frente a este micro-organismo.

Na associação dos extratos e frações de *E. pyrifomis* e Vancomicina frente a *S. aureus*, observou-se que *E. pyrifomis* não interferiu na ação da Vancomicina, com valores de FICI entre 1,25 e 2,1249.

A Vancomicina atua afetando o metabolismo de construção da parede celular bacteriana, enquanto que os metabólitos secundários das plantas podem facilitar a penetração da droga através de camadas exteriores da parede celular, bloquear os efeitos inibidores de enzimas protetoras, ou ainda interferir em alvos metabólicos dos antibióticos, variando de acordo com as diferentes bactérias (HEMAISWARYA, KRUTHIVENTI, DOBLE, 2008; PEI *et al.*, 2009; PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010; CHUNG; NAVARATNAM; CHUNG, 2011; YU *et al.*, 2012). Desta forma, as interações sinérgicas observadas neste estudo, podem ser resultado de distintos mecanismos de ação exercidos pela fração hidroalcoólica de *E. pyrifomis* e pela Vancomicina, contribuindo para o aumento da atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*.

As Figuras 11 e 12 ilustram os ensaios da avaliação do potencial sinérgico de *E. pyrifomis* pela técnica *Checkerbord* frente aos micro-organismos Gram-positivos.

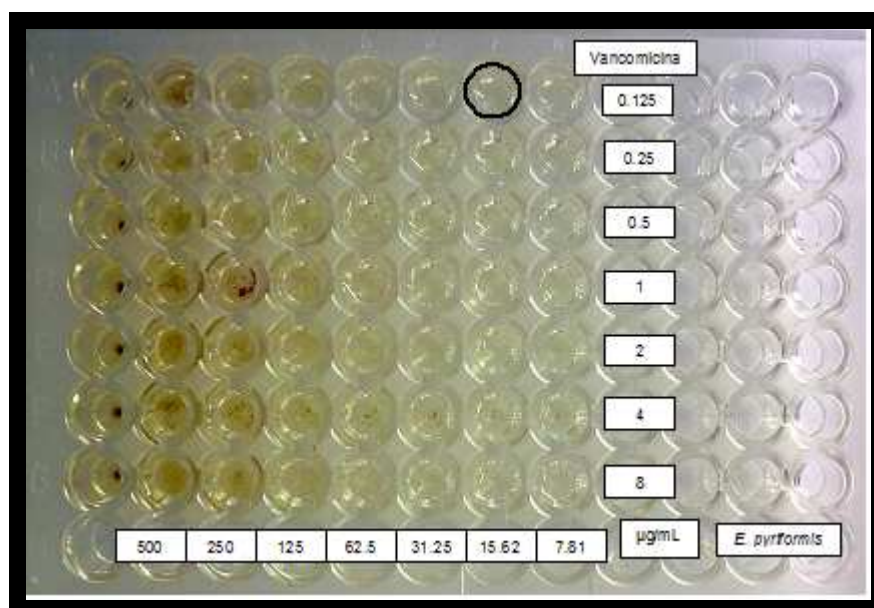


FIGURA 11 - ENSAIO DO POTENCIAL SINÉRGICO DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DE FOLHA DE *E. pyriformis* E VANCOMICINA FRENTE A *E. faecalis* PELA TÉCNICA CHECKERBOARD

FONTE: O autor (2013)

Áreas circundadas em negrito: CIM mais efetiva da amostra combinada

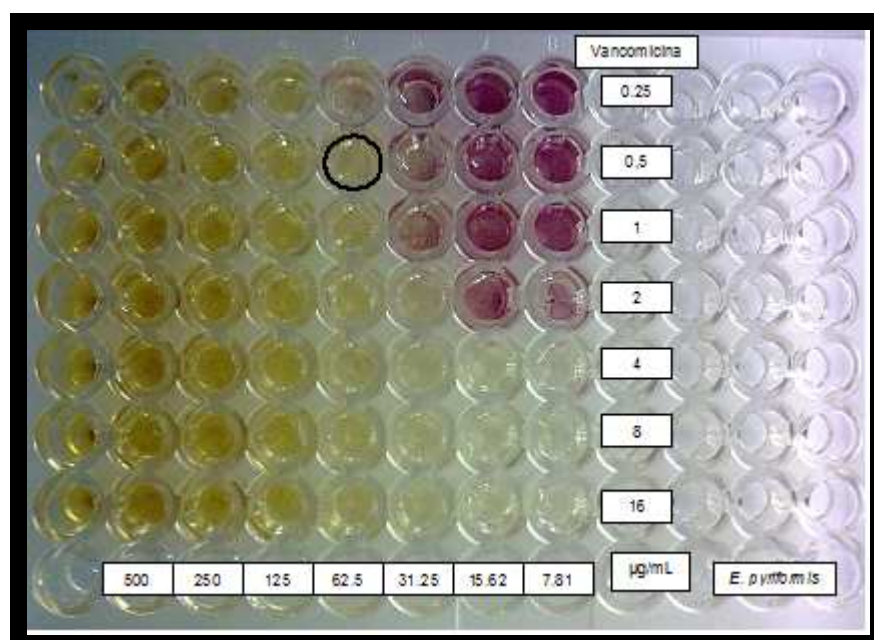


FIGURA 12 - ENSAIO DO POTENCIAL SINÉRGICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *E. pyriformis* E VANCOMICINA FRENTE A *S. aureus* PELA TÉCNICA CHECKERBOARD

FONTE: O autor (2013)

Áreas circundadas em negrito: CIM mais efetiva da amostra combinada

Neste estudo, várias associações de diferentes concentrações entre os extratos e frações de *E. pyriformis* e Vancomicina (CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4, CIMx8) foram testadas para *E. faecalis* e *S. aureus*, obtendo-se assim CIMs para cada concentração. Estes valores foram plotados em gráficos, de forma a se comparar as CIMs obtidas nestas várias concentrações com a CIM independente (CIM₀) das amostras de extratos e frações de *E. pyriformis*, mostrando a atividade inibitória e as interações produzidas em cada concentração frente a estes micro-organismos (Figuras 13 a 15).

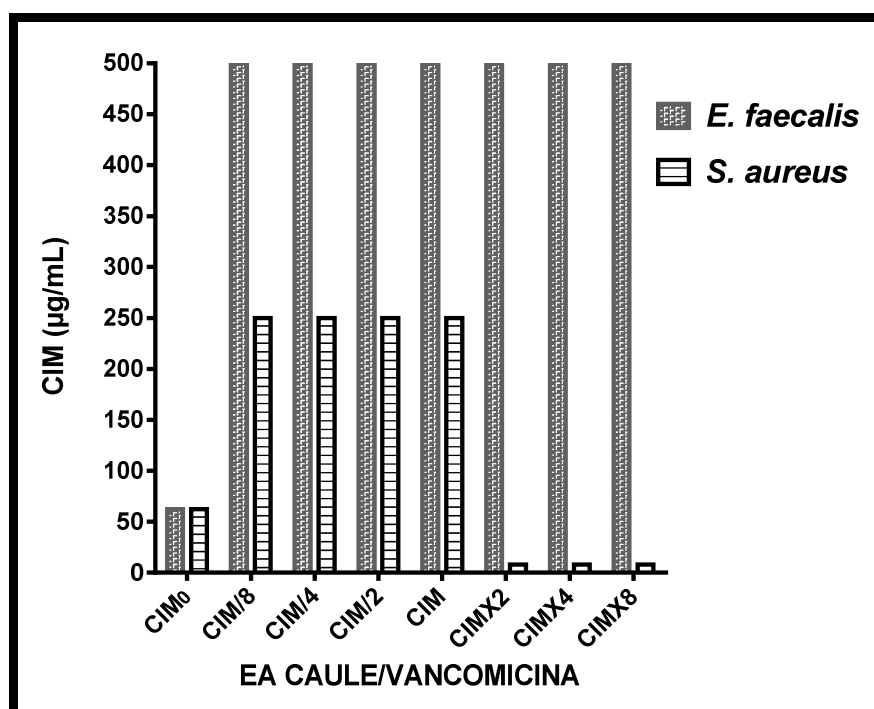


FIGURA 13 - VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE CAULE DE *E. pyriformis* COM VANCOMICINA FRENTE A *E. faecalis* E *S. aureus*

FONTE: O autor (2013)

A Figura 13 mostra que as associações de extrato acetônico de caule e Vancomicina demonstraram uma maior atividade inibitória sobre *S. aureus*, com CIMs inferiores a 300 µg/mL, comparadas as CIMs obtidas frente a *E. faecalis*, que resultaram em valores acima de 500 µg/mL. As associações testadas frente a *E. faecalis* resultaram em CIMs acima da CIM₀ de 62,5 µg/mL do extrato acetônico de caule, evidenciando reações de antagonismo. Para *S. aureus*, a associação de

extrato acetônico de caule e Vancomicina mais efetiva foi encontrada em CIMx2, 15,62 $\mu\text{g/mL}$, abaixo da CIM₀ de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ do extrato acetônico de caule, resultando em efeitos de aditividade. Para o extrato acetônico de folha testado em associação com Vancomicina frente a *E. faecalis* foram observados resultados de antagonismo.

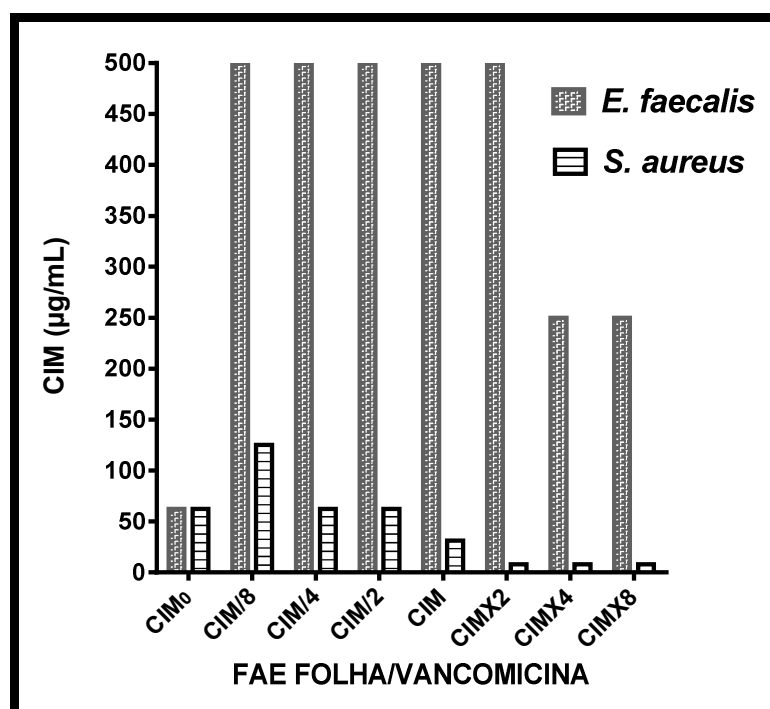


FIGURA 14 - VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *E. pyrifolia* COM VANCOMICINA FRENTE A *E. faecalis* E *S. aureus*

FONTE: O autor (2013)

A Figura 14 mostra que as associações da fração acetato de etila de folha e Vancomicina frente a *E. faecalis* resultaram em CIMs acima de 250 $\mu\text{g/mL}$, valores que superam a CIM₀ de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ da fração acetato de etila, demonstrando interações de antagonismo em todas as combinações. Para *S. aureus*, a associação da fração acetato de etila de folha e Vancomicina mostrou CIMs abaixo de 125 $\mu\text{g/mL}$ em todas as combinações. As interações observadas foram aditividade em CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2 e antagonismo em CIMx4 e CIMx8.

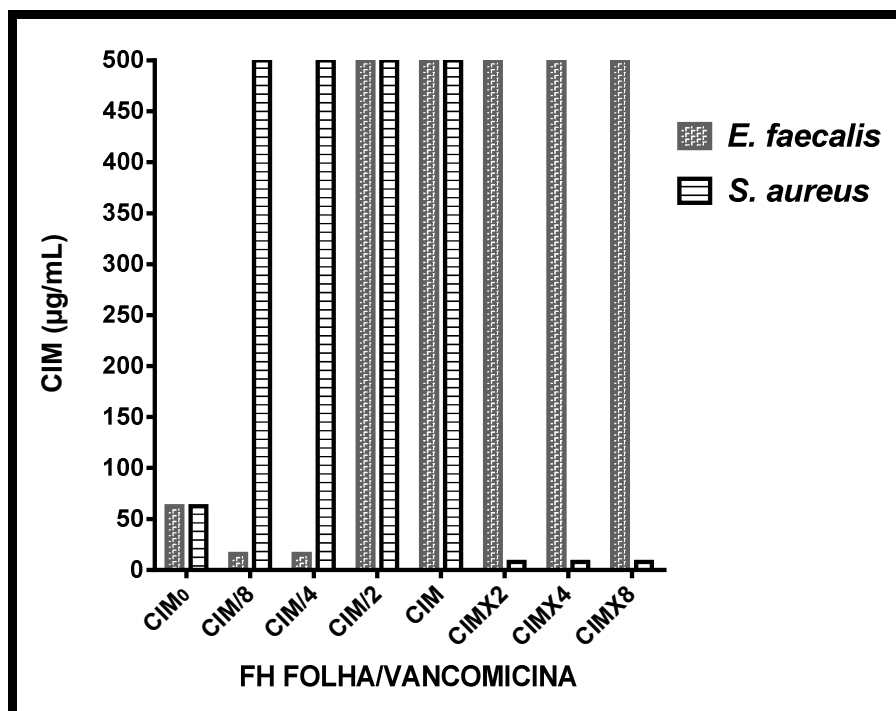


FIGURA 15 - VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DE FOLHA DE *E. pyriformis* COM VANCOMICINA FRENTE A *E. faecalis* E *S. aureus*

FONTE: O autor (2013)

A Figura 15 mostra que a associação da fração hidroalcoólica de folha e Vancomicina frente a *E. faecalis* demonstrou CIM de 15,62 µg/mL em CIM/8 e CIM/4, resultando em atividade sinérgica. Porém, nas demais associações, os resultados foram de antagonismo, com CIMs acima de 500 µg/mL. Para *S. aureus* as CIMs foram acima de 500 µg/mL para as quatro primeiras associações, resultando em antagonismo, e a partir da associação CIMx2, mostrou CIMs de 7,81 µg/mL. A combinação CIMx2 teve como resultado um efeito de aditividade e CIMx4 e CIMx8 efeito de antagonismo.

Os resultados observados neste estudo comparativo mostram que a associação de extratos e frações de *E. pyriformis* e Vancomicina contra *E. faecalis* e *S. aureus* apresentaram menor atividade inibitória em relação ao observado pelos extratos e frações quando avaliados de forma independente. De forma geral houve interferência exercida pelas amostras sobre a Vancomicina, indicando antagonismo, aditividade e sinergismo.

Para o estudo de associação com o antifúngico Fluconazol foram utilizadas cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

O gênero *Candida*, com cerca de 200 espécies de leveduras é um comensal oportunista humano da cavidade oral, superfícies vaginais, gastrointestinais, cutâneas e das mucosas. *Candida albicans* é o organismo causador mais predominante de todos os tipos de candidíase, mas outras espécies de *Candida*, incluindo *C. krusei* e *C. parapsilosis* estão colocando sérias ameaças em pacientes hospitalares. O fármaco utilizado para infecções de *Candida* são os azóis, sendo um deles o Fluconazol, amplamente utilizado, devido a sua elevada solubilidade, baixa toxicidade e de fácil distribuição nos tecidos (AHMAD *et al.*, 2010). Porém, falhas de tratamento têm aumentado, com o uso prolongado destes fármacos, estimulando a pesquisa de novas estratégias terapêuticas. A terapia de combinação é uma alternativa que pode melhorar a eficácia do Fluconazol e de outros agentes antifúngicos (PINTO *et al.*, 2009).

A análise da associação de *E. pyriformis* com o antifúngico Fluconazol (Tabela 5) demonstrou interações entre o extrato bruto de folha para os micro-organismos *C. krusei* e *C. parapsilosis*, o extrato acetônico de folha para *C. krusei* e a fração acetato de etila de folha para *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, com sinergismo nítido e capaz de reduzir o crescimento microbiano de forma mais eficiente que quando o fármaco foi testado isoladamente.

A fração acetato de etila de folha em associação mostrou resultados relevantes para as três espécies de *Candida* (Figura 16, 17 e 18). Quanto ao extrato bruto e o extrato acetônico de folha, verifica-se interação sinérgica apenas frente a *C. krusei* ou *C. parapsilosis* ou ambas as espécies.

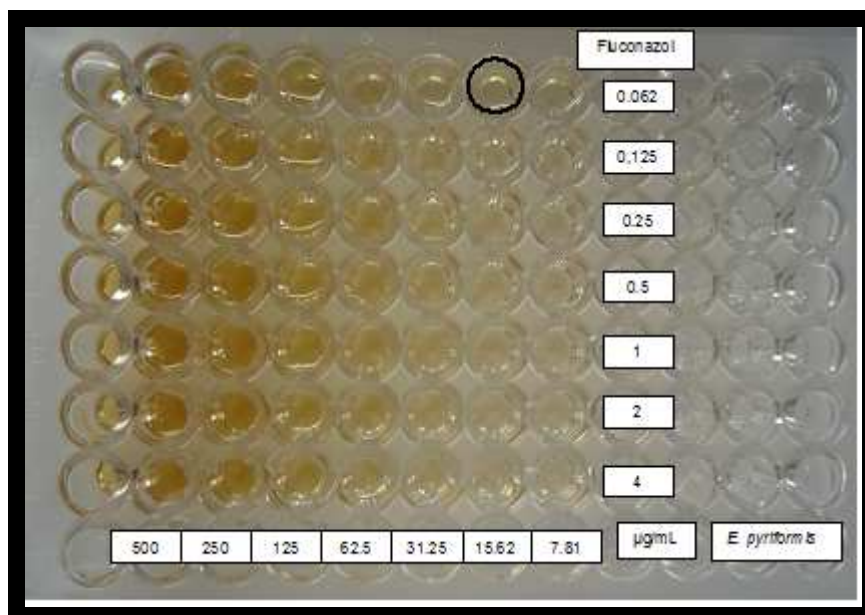


FIGURA 16 - ENSAIO DO POTENCIAL SINÉRGICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL FRENTE A *C. albicans* PELA TÉCNICA *CHECKERBOARD*

FONTE: O autor (2013)

Áreas circundadas em negrito: CIM mais efetiva da amostra combinada

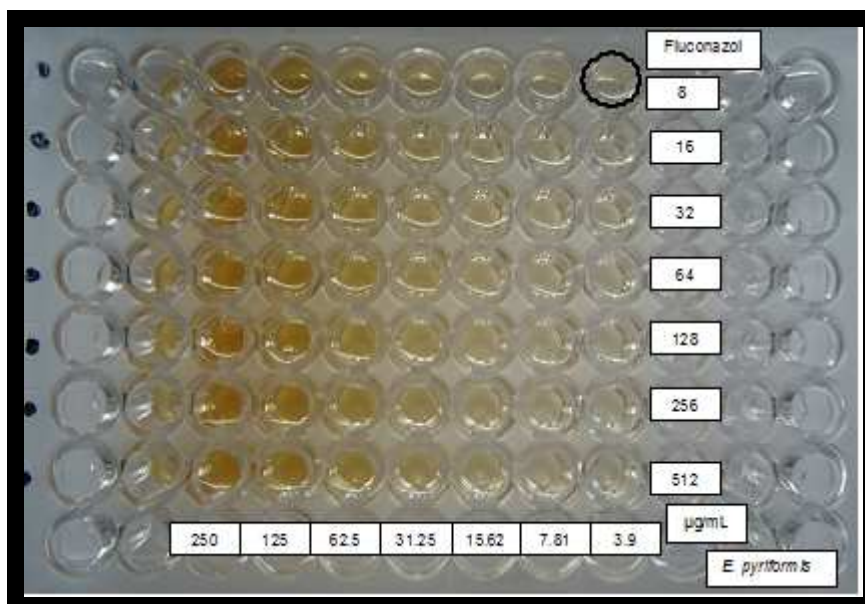


FIGURA 17 - ENSAIO DO POTENCIAL SINÉRGICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL FRENTE A *C. krusei* PELA TÉCNICA *CHECKERBOARD*

FONTE: O autor (2013)

Áreas circundadas em negrito: CIM mais efetiva da amostra combinada

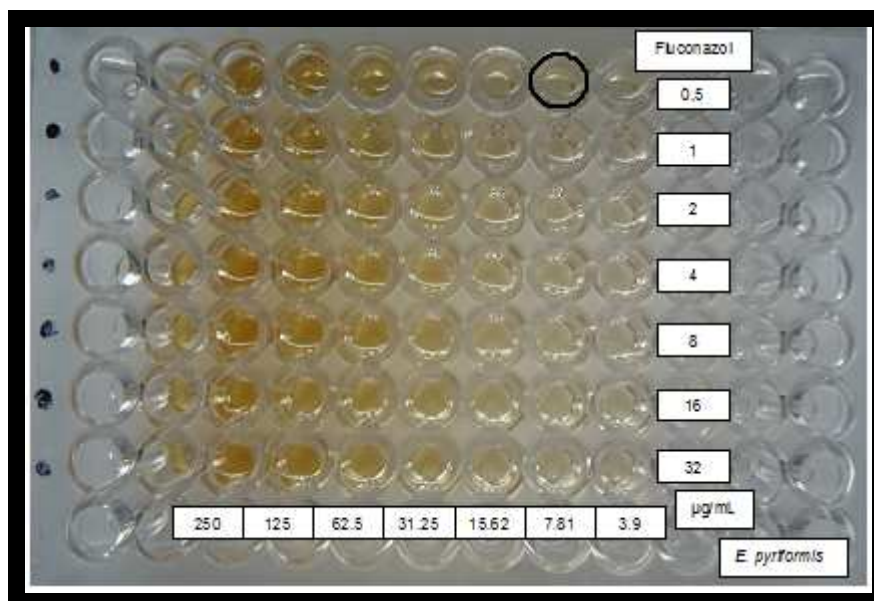


FIGURA 18 - ENSAIO DO POTENCIAL SINÉRGICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL FRENTE A *C. parapsilosis* PELA TÉCNICA CHECKERBOARD

FONTE: O autor (2013)

Áreas circundadas em negrito: CIM mais efetiva da amostra combinada

O estudo indicou que houve interações de aditividade nas associações de Fluconazol com extrato bruto de caule frente a *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, com extrato bruto de folha frente a *C. albicans*, com extrato acetônico de caule frente a *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* e com extrato acetônico de folha frente a *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Os valores encontrados em seus FICIs oscilaram entre 0,6243 e 2,4998.

Os resultados das associações de diferentes concentrações de extratos e frações de *E. pyriformis* e Fluconazol (CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4, CIMx8) foram plotados em gráficos, de forma a se comparar as CIMs obtidas nestas várias associações com a CIM independente (CIM₀) das amostras de extratos e frações de *E. pyriformis*, observando a atividade inibitória e as interações produzidas em cada concentração frente a *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (Figuras 19 a 23).

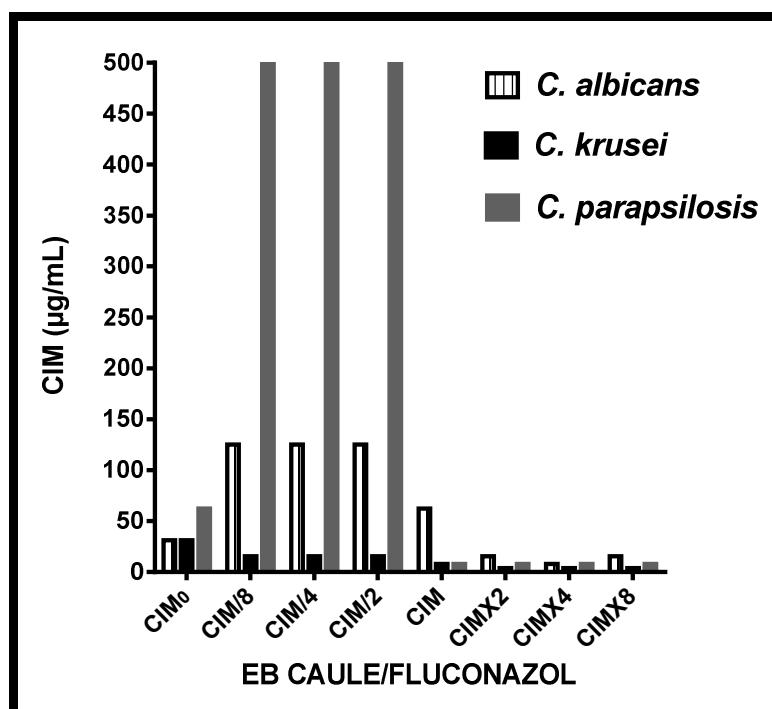


FIGURA 19 - VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE CAULE DE *E. pyriformis* COM FLUCONAZOL FRENTE A *C. albicans*, *C. krusei* E *C. parapsilosis*

FONTE: O autor (2013)

A Figura 19 mostra que as associações do extrato bruto de caule de *E. pyriformis* e Fluconazol contra os fungos leveduriformes apresentam diferentes CIMs para cada espécie testada. As associações CIM/8, CIM/4 e CIM/2 mostraram CIMs de 125 µg/mL para *C. albicans*, de 31,25 µg/mL para *C. krusei* e acima de 500 µg/mL para *C. parapsilosis*. Nas associações CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8 os valores obtidos estão abaixo de 62,5 µg/mL, próximos ao valor da CIM₀ do extrato bruto de caule. Os resultados demonstraram interações de aditividade e antagonismo para as três espécies.

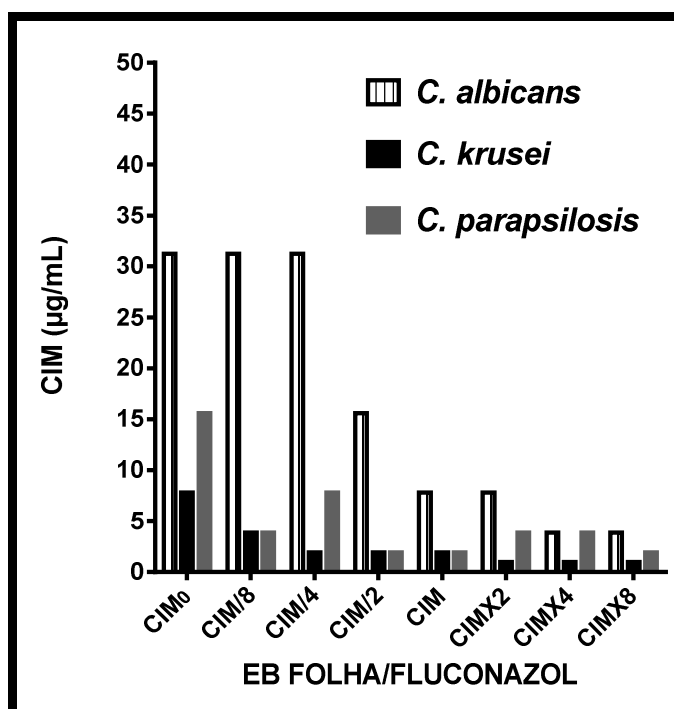


FIGURA 20 - VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE FOLHA DE *E. pyriformis* COM FLUCONAZOL FRENTE A *C. albicans*, *C. krusei* E *C. parapsilosis*

FONTE: O autor (2013)

A Figura 20 mostra que as associações do extrato bruto de folha e Fluconazol contra fungos leveduriformes apresentaram CIMs com valor igual ou menor a CIM₀ do extrato bruto de folha. As associações mais efetivas foram CIM/2 para *C. albicans* com aditividade, CIM/4 para *C. krusei* com sinergismo e CIM/8 para *C. parapsilosis* com sinergismo. Em relação a *C. krusei* e *C. parapsilosis*, a associação mais efetiva foi obtida em concentrações quatro vezes menores que a CIM de suas amostras independentes, resultando em CIMs de 1,95 e 3,9 µg/mL, respectivamente.

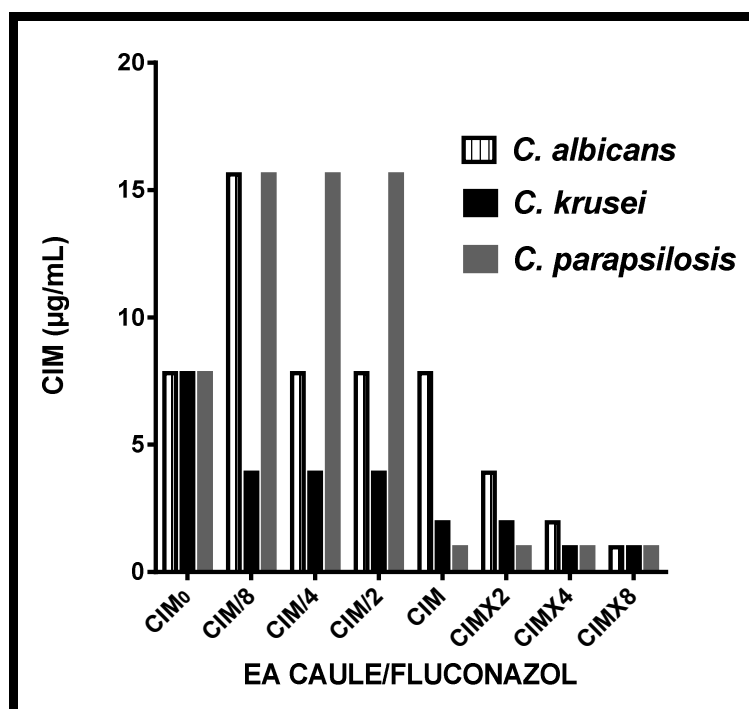


FIGURA 21 - VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE CAULE DE *E. pyriformis* COM FLUCONAZOL FRENTE A *C. albicans*, *C. krusei* E *C. parapsilosis*

FONTE: O autor (2013)

O gráfico da Figura 21 expressa os resultados obtidos pelas associações do extrato acetônico de caule e Fluconazol. As CIMS obtidas para *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram semelhantes oscilando entre uma espécie e outra somente em uma concentração. Em relação a *C. krusei* os valores de CIMS foram abaixo da CIM₀ do extrato acetônico de caule em todas as concentrações testadas. Nas associações CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM e CIMx2 as interações obtidas foram aditividade e em CIMx4 e CIMx8 de antagonismo nas três espécies estudadas.

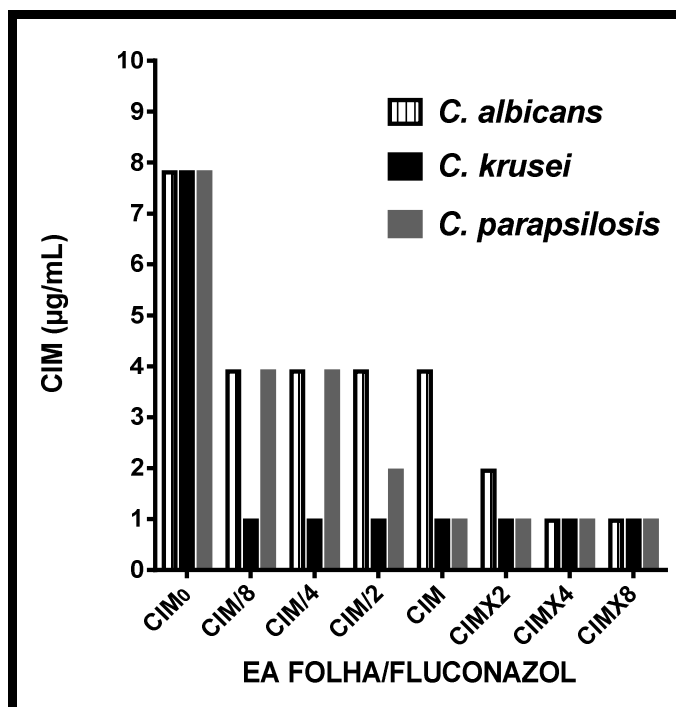


FIGURA 22 - VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE FOLHA DE *E. pyrifolius* COM FLUCONAZOL FRENTE A *C. albicans*, *C. krusei* E *C. parapsilosis*

FONTE: O autor (2013)

A Figura 22 mostra que o estudo da associação do extrato acetônico de folha e Fluconazol frente a *C. krusei* demonstrou resultado significativo em todas as associações testadas, com as CIMs obtidas abaixo da CIM₀ do extrato acetônico de folha. Nas associações CIM/8 e CIM/4 foram observadas interações de sinergismo, CIM/2, CIM e CIMx2 interações de aditividade e em CIMx4 e CIMx8 interações de antagonismo. Os resultados frente a *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram semelhantes, resultando nas associações CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM e CIMx2 em interações de aditividade e em CIMx4 e CIMx8 de antagonismo para estas duas espécies.

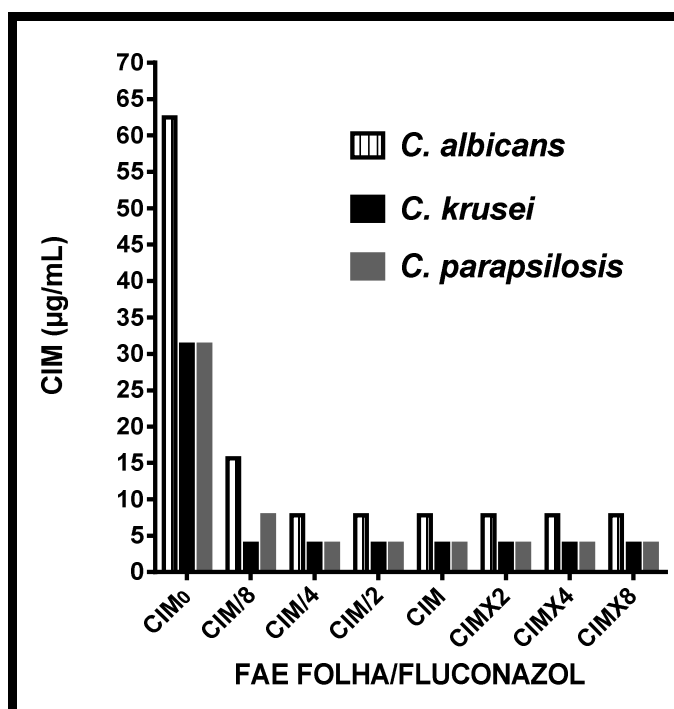


FIGURA 23 - VALORES DE CIMs DE DIFERENTES ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *E. pyriformis* COM FLUCONAZOL FRENTE A *C. albicans*, *C. krusei* E *C. parapsilosis*

FONTE: O autor (2013)

A Figura 23 mostra resultados expressivos encontrados na associação da fração acetato de etila de folha e Fluconazol frente aos fungos leveduriformes. As associações testadas provocaram uma resposta inibitória semelhante para as três espécies de *Candida*, com CIMs abaixo da CIM₀ da fração acetato de etila de folha. Nas associações CIM/8 e CIM/4 foram observadas interações de sinergismo, em CIM/2, CIM e CIMx2 interações de aditividade e em CIMx4 e CIMx8 interações de antagonismo.

Observou-se na avaliação do potencial sinérgico pela técnica *Checkerboard* que dentre as concentrações estudadas CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8, foi possível a ocorrência de interações de sinergismo somente nas associações CIM/8 e CIM/4. Na associação CIMx8 ocorreu interação de antagonismo para todas as associações estudadas.

A forma gráfica para representar os resultados de estudos de associação é através da utilização de um isoblograma introduzida por Loewe e Muischnek (1926). Os isoblogramas foram construídos calculando-se o FIC das associações CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4, através da relação entre a CIM de cada

concentração e a CIM independente de cada amostra. A associação CIMx8 não foi analisada nesta representação, pois apresentou interação de antagonismo em todas as associações de extratos e frações de *E. pyriformis* com os antimicrobianos testados. Os valores de FIC foram plotados, através do programa GraphPadPrism® Versão 6, onde foram traçadas linhas permitindo a visualização das interações encontradas. As interações foram classificadas com atividade de sinergismo ($\leq 0,5$); aditividade (entre 0,5 e 4,0) e antagonismo ($>4,0$) (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008; PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010; CHUNG; NAVARATNAM; CHUNG, 2011).

As associações de extrato acetônico de caule, extrato acetônico de folha, fração acetato de etila de folha e Vancomicina frente ao micro-organismo *E. faecalis* demonstraram efeito antagônico para as seis associações testadas com valores de FIC acima de 4,0 (Figura 24, 25 e 26).

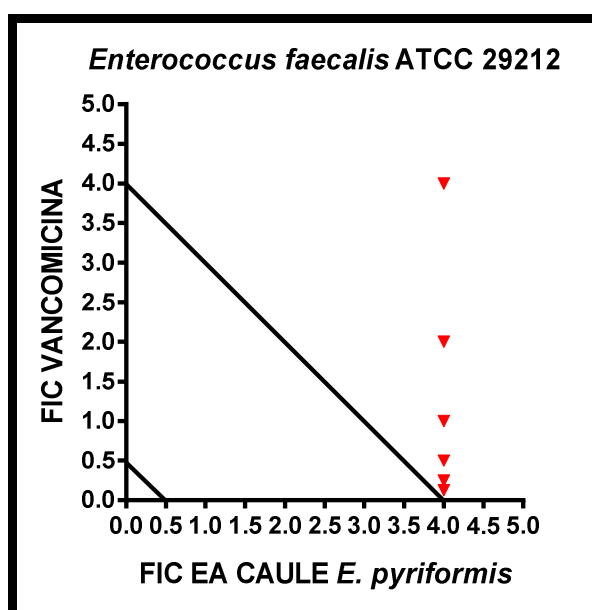


FIGURA 24 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE CAULE DE *E. pyriformis* E VANCOMICINA COM *E. faecalis*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ▼ Antagonismo (FIC acima de 4,0)

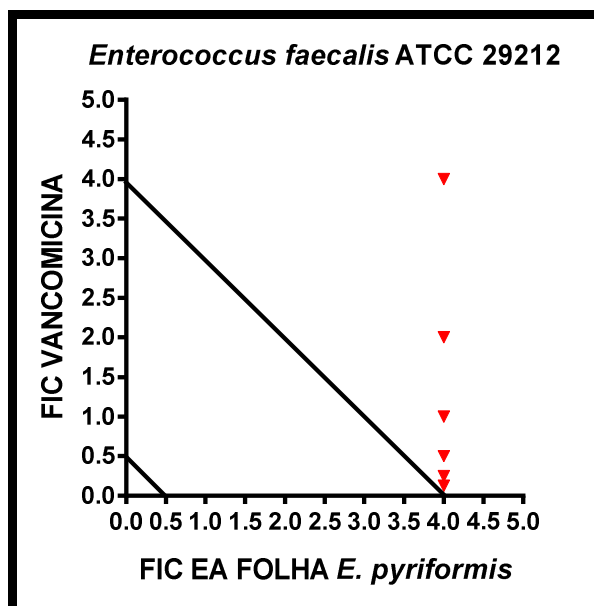


FIGURA 25 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE FOLHA DE *E. pyrifolmis* E VANCOMICINA COM *E. faecalis*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ▼ Antagonismo (FIC acima de 4,0)

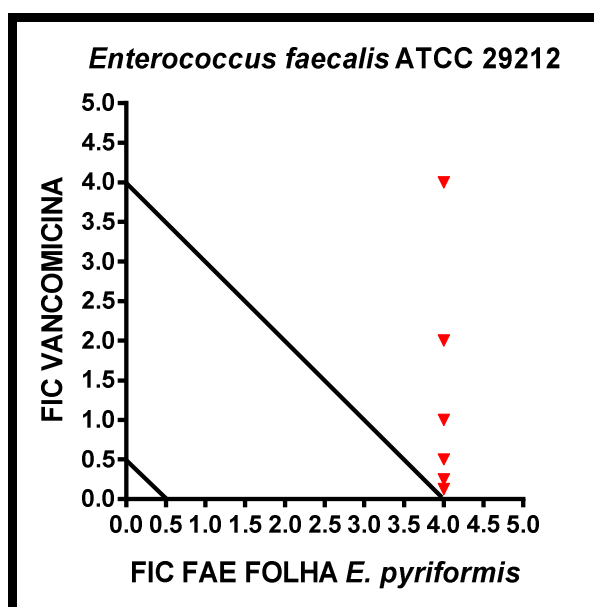


FIGURA 26 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *E. pyrifolmis* E VANCOMICINA COM *E. faecalis*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ▼ Antagonismo (FIC acima de 4,0)

O isoblograma das associações de fração hidroalcoólica de folha e Vancomicina frente a *E. faecalis* demonstrou sinergismo para duas associações analisadas com valores de FICl $\leq 0,5$ e efeito antagônico para quatro associações com valores de FIC superiores a 4,0 (Figura 27).

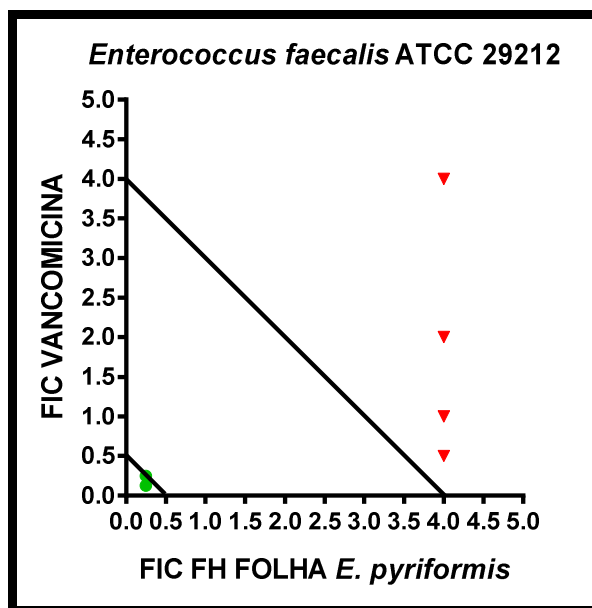


FIGURA 27 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DE FOLHA DE *E. pyrifomis* E VANCOMICINA COM *E. faecalis*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ● Sinergismo (FIC $\leq 0,5$)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

Os extratos e frações de *E. pyrifomis* frente a *E. faecalis* foram pouco eficazes na redução da CIM do antibiótico em estudo, resultando em efeito de antagonismo na maioria das associações analisadas. Apesar de sua boa atividade antimicrobiana quando utilizados de maneira independente, mostrou atividade sinérgica somente em duas associações de fração hidroalcoólica com a Vancomicina frente a este micro-organismo. O antagonismo encontrado na maioria das associações com *E. faecalis* pode ser atribuída a mecanismos de ação semelhantes entre os glicosídeos flavônicos e esteróides/triterpenóides encontrados no screening fitoquímico dos extratos e frações da *E. pyrifomis* e do antimicrobiano Vancomicina.

O isobolograma das associações de extrato acetônico de caule, da fração hidroalcoólica de folha e Vancomicina frente a *S. aureus* demonstrou em cinco das associações analisadas efeito antagônico com valores de FIC superiores a 4,0 e uma das associações ocorreu interação de aditividade (Figura 28 e 29).

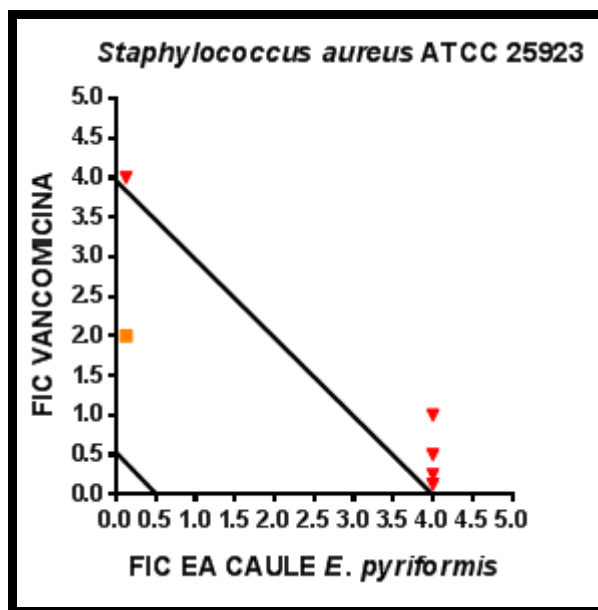


FIGURA 28 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE CAULE DE *E. pyriformis* E VANCOMICINA COM *S. aureus*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

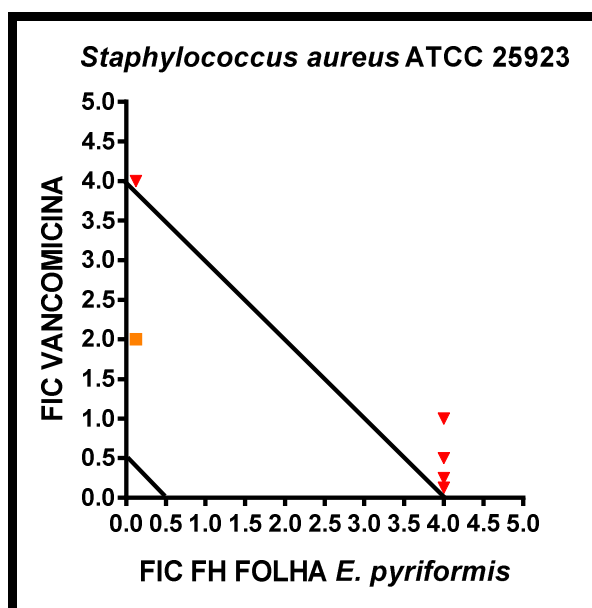


FIGURA 29 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DE FOLHA DE *E. pyriformis* E VANCOMICINA COM *S. aureus*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

O isoblograma das associações de fração acetato de etila de folha e Vancomicina frente a *S. aureus* demonstrou aditividade para cinco associações analisadas com valores de FIC entre 0,5 e 4,0 e uma associação com atividade antagônica (Figura 30).

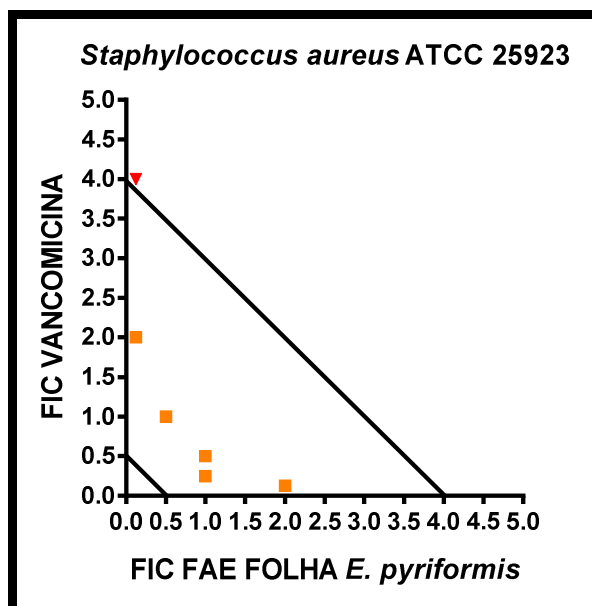


FIGURA 30 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *E. pyriformis* E VANCOMICINA COM *S. aureus*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

As amostras testadas frente a *S. aureus* também não se mostraram eficazes na redução da CIM do antibiótico em estudo. Neste estudo não foram observadas interações de sinergismo, porém em várias associações foi evidenciado efeito de aditividade.

Observou-se que para cinco associações da fração acetato de etila e Vancomicina contra *S. aureus* ocorreu interações de aditividade, e de maneira contrária, frente a *E. faecalis* demonstrou cinco associações com interação de antagonismo.

O isobolograma das associações do extrato bruto de caule e Fluconazol frente a *C. albicans* demonstrou antagonismo em quatro associações com valores de FIC acima de 4,0 e aditividade para duas associações analisadas com valor entre 0,5 e 4,0 (Figura 31).

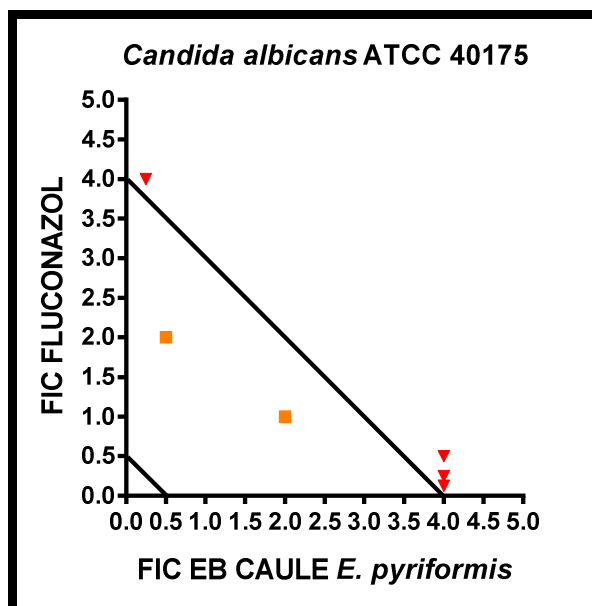


FIGURA 31 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE CAULE DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL COM *C. albicans*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

O isobolograma das associações do extrato bruto de folha, do extrato acetônico de folha e de extrato acetônico de caule e Fluconazol frente a *C. albicans* demonstrou efeito de aditividade em cinco associações com valores entre 0,5 e 4,0 e antagonismo para uma associação com valor acima de 4,0 (Figura 32, 33 e 34).

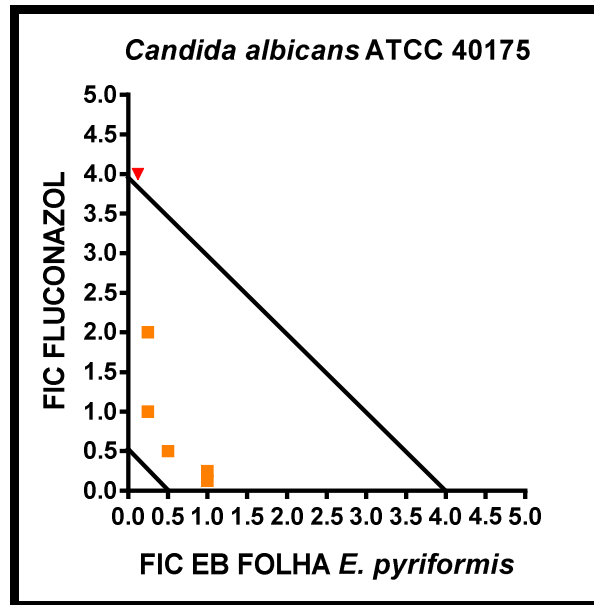


FIGURA 32 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE FOLHA DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL COM *C. albicans*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

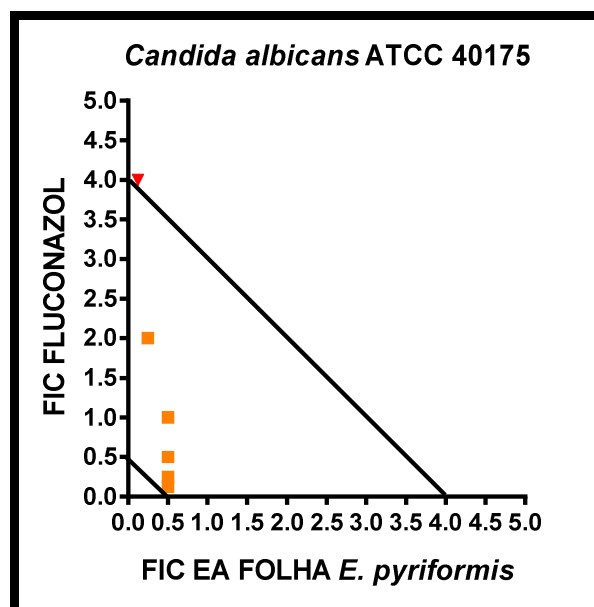


FIGURA 33 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE FOLHA DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL COM *C. albicans*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

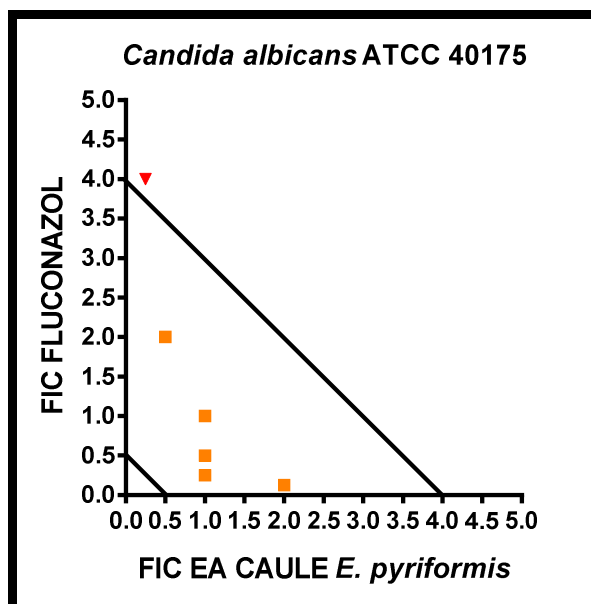


FIGURA 34 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE CAULE DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL COM *C. albicans*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

O isoblograma das associações de fração acetato de etila de folha e Fluconazol frente a *C. albicans* demonstrou sinergismo para duas associações com valores de FIC abaixo de 0,5, três associações com aditividade e uma associação com interação de antagonismo (Figura 35).

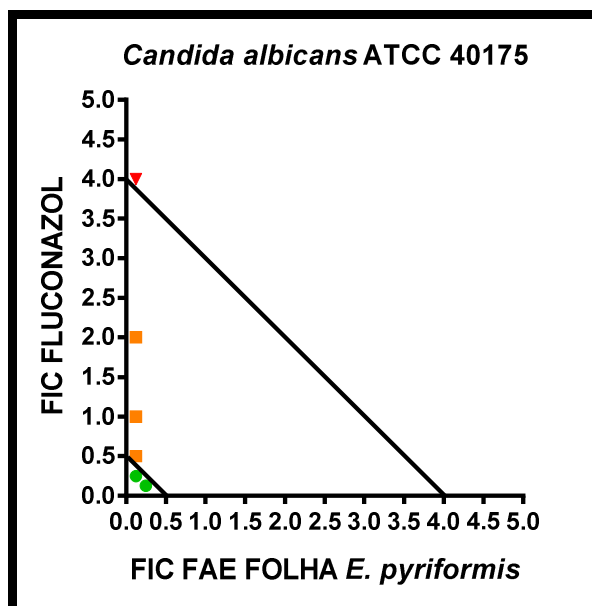


FIGURA 35 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *E. pyrifolmis* E FLUCONAZOL COM *C. albicans*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ● Sinergismo $\leq 0,5$

■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

O isobolograma das associações de extrato bruto e extrato acetônico de caule de *E. pyrifolmis* e Fluconazol frente a *C. krusei* demonstrou aditividade para cinco associações entre 0,5 e 4,0 e uma associação com atividade antagônica com valor acima de 4,0 (Figura 36 e 37).

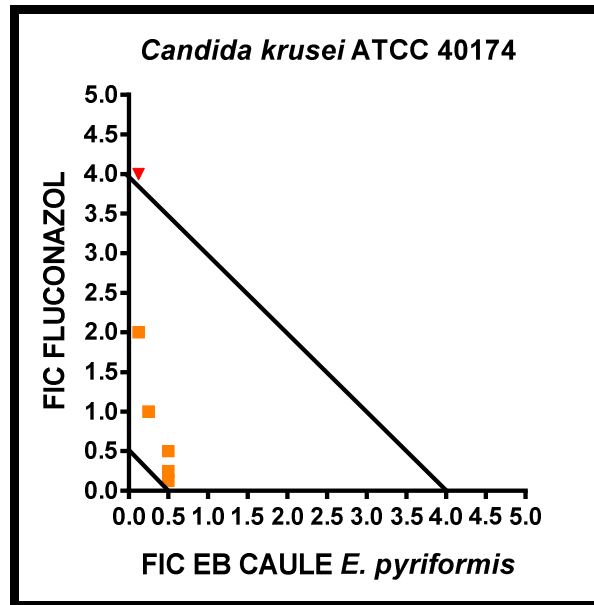


FIGURA 36 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE CAULE DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL COM *C. krusei*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

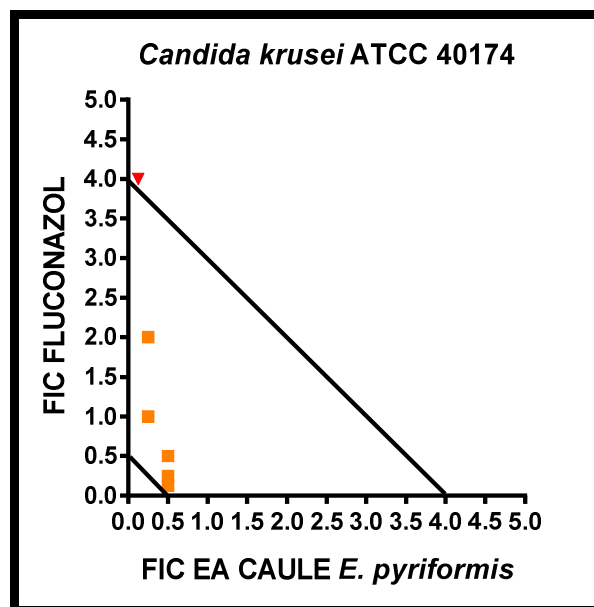


FIGURA 37 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE CAULE DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL COM *C. krusei*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

O isobolograma das associações de extrato bruto de folha e Fluconazol frente a *C. krusei* demonstrou sinergismo para uma associação com valor de FIC abaixo de 0,5, três associações com aditividade e uma associação com antagonismo (Figura 38).

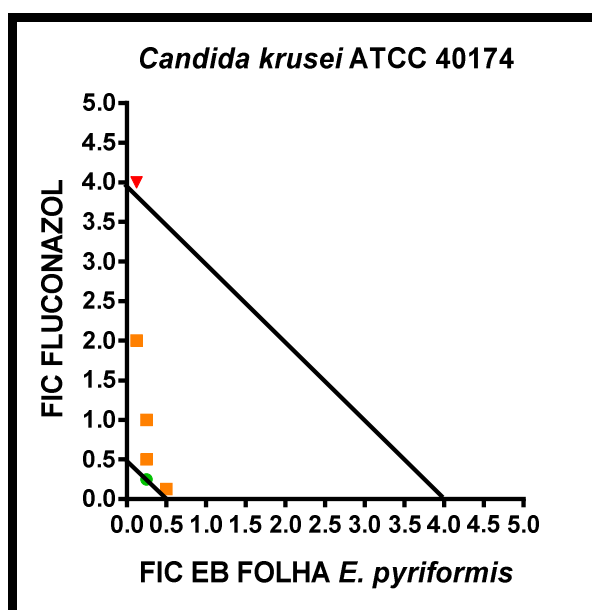


FIGURA 38 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE FOLHA DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL COM *C. krusei*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ● Sinergismo $\leq 0,5$

■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

O isobolograma das associações de extrato acetônico de folha e a fração acetato de etila de folha e Fluconazol frente a *C. krusei* demonstrou sinergismo para duas associações abaixo de 0,5, três associações com aditividade entre 0,5 e 4,0 e uma associação com antagonismo com FIC acima de 4,0 (Figura 39 e 40).

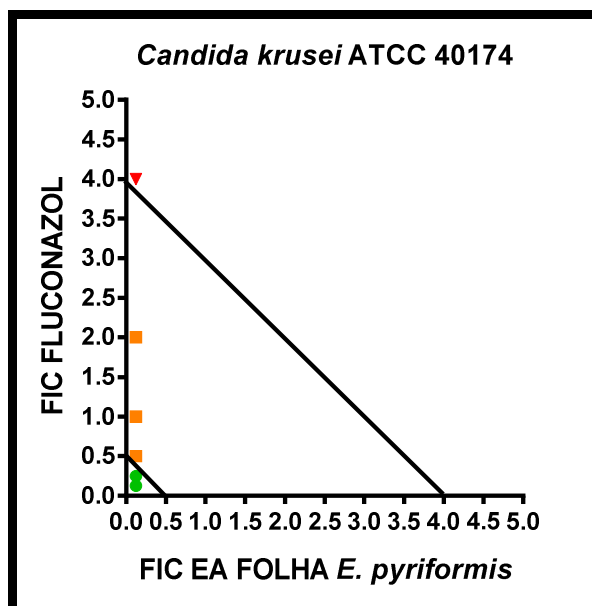


FIGURA 39 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE FOLHA DE *E. pyrifolia* E FLUCONAZOL COM *C. krusei*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ● Sinergismo $\leq 0,5$

■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

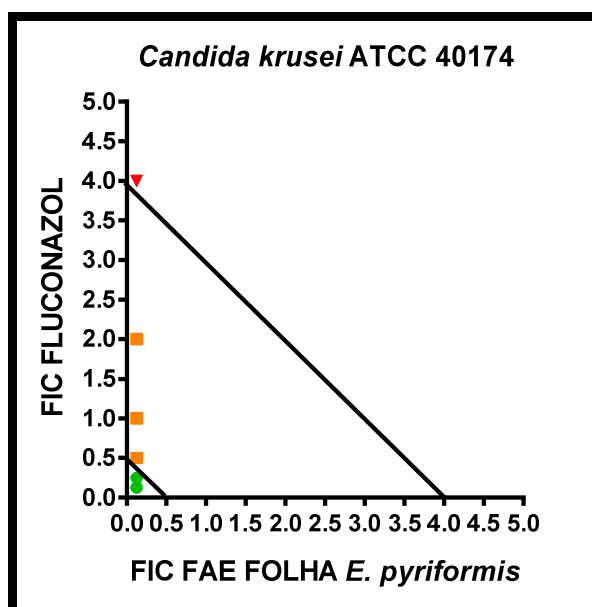


FIGURA 40 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *E. pyrifolia* E FLUCONAZOL COM *C. krusei*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ● Sinergismo $\leq 0,5$

■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

O isobolograma das associações de extrato bruto de caule e Fluconazol frente a *C. parapsilosis* demonstrou efeito antagônico para quatro associações e efeito de aditividade para duas associações (Figura 41).

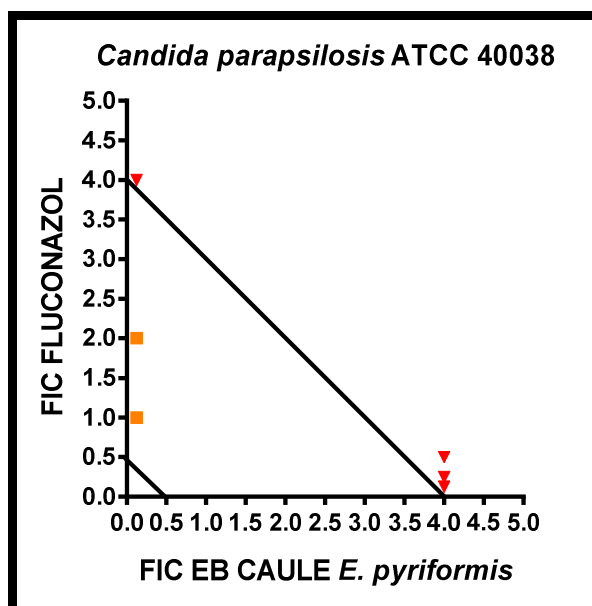


FIGURA 41 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE CAULE DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL COM *C. parapsilosis*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ● Sinergismo $\leq 0,5$

■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

O isobolograma das associações de extrato bruto de folha e Fluconazol frente a *C. parapsilosis* demonstrou efeito de sinergismo para uma associação, quatro associações com efeito de aditividade com valores entre 0,5 e 4,0 e uma associação com antagonismo acima de 4,0 (Figura 42).

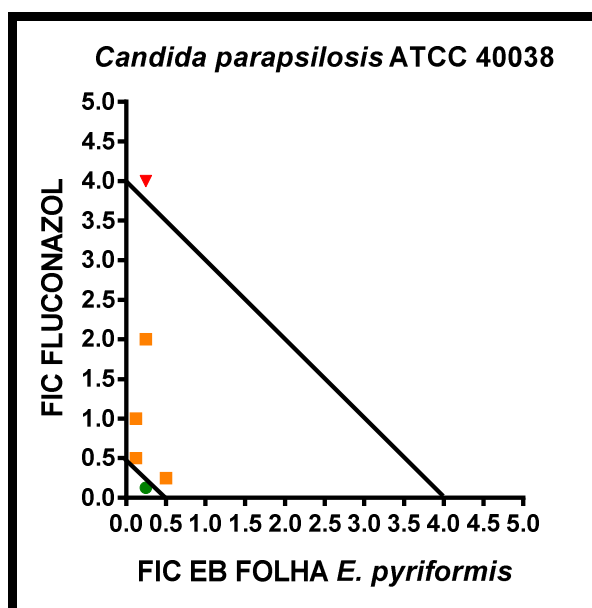


FIGURA 42 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO BRUTO DE FOLHA DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL COM *C. parapsilosis*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ● Sinergismo $\leq 0,5$

■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC $> 4,0$)

O isobolograma das associações de extrato acetônico de caule, extrato acetônico de folha e Fluconazol frente a *C. parapsilosis* demonstrou aditividade para cinco associações com valores entre 0,5 e 4,0 e uma com antagonismo, com valores de FIC acima de 4,0 (Figura 43 e 44).

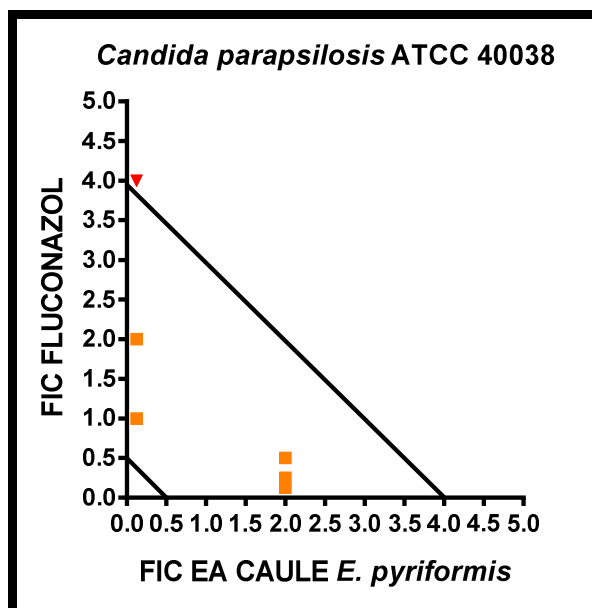


FIGURA 43 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE CAULE DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL COM *C. parapsilosis*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

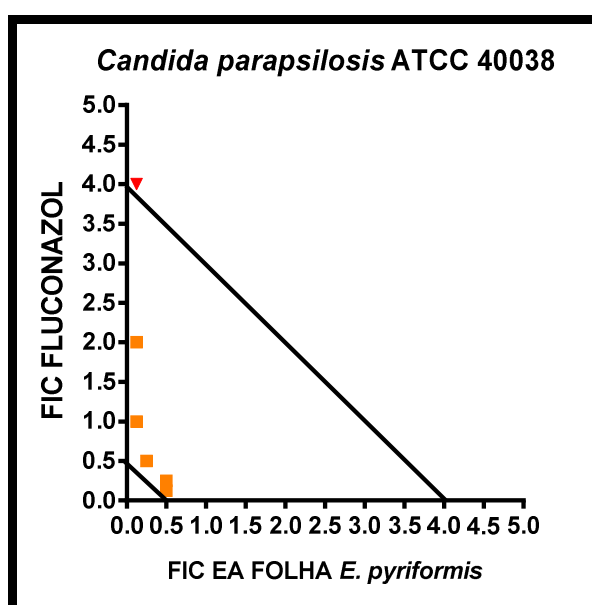


FIGURA 44 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE EXTRATO ACETÔNICO DE FOLHA DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL COM *C. parapsilosis*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

O isobolograma das associações da fração acetato de etila de folha e Fluconazol frente a *C. parapsilosis* demonstrou efeito de sinergismo para duas associações abaixo de 0,5, três associações com efeito de aditividade e uma associação com antagonismo acima de 4,0 (Figura 45).

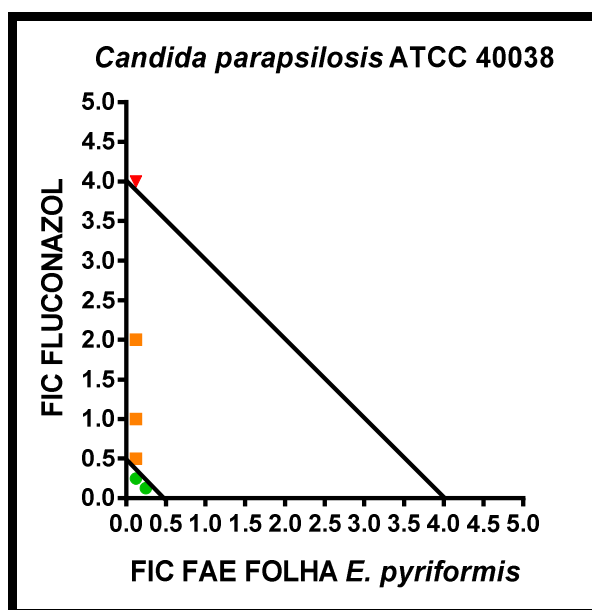


FIGURA 45 - ISOBOLOGRAMA DAS ASSOCIAÇÕES DE FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *E. pyriformis* E FLUCONAZOL COM *C. parapsilosis*

FONTE: O autor (2013)

NOTA: ● Sinergismo $\leq 0,5$

■ Aditividade (FIC entre 0,5 e 4,0)

▼ Antagonismo (FIC > 4,0)

Neste ensaio de sinergismo verificaram-se, tanto pelo cálculo do FICI como pela representação através dos isobologramas, resultados promissores entre a associação de extratos e frações de *E. pyriformis* e Fluconazol sobre três espécies de *Candida*. A fração acetato de etila de folha mostrou nas associações CIM/8 e CIM/4 atividade sinérgica sobre todas as espécies de *Candida* testadas, representando os valores mais expressivos encontrados neste estudo. O extrato bruto de folha frente a *C. krusei* na associação CIM/4 e contra *C. parapsilosis* em CIM/8 e para o extrato acetônico de folha frente a *C. krusei* em CIM/8 e CIM/4. Por

outro lado, o extrato bruto e o extrato acetônico de caule não demonstraram potencial sinérgico.

O estudo do potencial sinérgico revelou que os extratos e frações de *E. pyrifomis* mostraram destacável interferência sobre a atividade antibacteriana da Vancomicina e atividade antifúngica do Fluconazol, sendo observado efeitos sinérgicos e antagônicos sobre os micro-organismos testados.

Assim, o uso concomitante de espécies vegetais e fármacos merece um olhar cuidadoso, vista a possibilidade de ocorrer interferência ou servir como auxílio no tratamento de doenças infecciosas. Desta forma, convém ressaltar que, como as plantas medicinais são bastante utilizadas pela população, há necessidade de mais estudos que visem elucidar os efeitos prejudiciais que possam ocorrer com o uso concomitante de antimicrobianos.

5 CONCLUSÃO

Os extratos e frações de *E. pyrifomis* mostraram uma inibição mais efetiva sobre os micro-organismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) que em Gram-negativos (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e eficaz atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans* ATCC 40175, *Candida krusei* ATCC 40147 e *Candida parapsilosis* ATCC 40038.

O teste de bioautografia permitiu detectar a ocorrência de zonas de inibição nos ensaios frente às bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos leveduriformes.

A técnica da bioautografia em comparação a microdiluição apresentou maior sensibilidade na detecção de compostos bioativos presentes nas amostras de *E. pyrifomis*.

Os extratos brutos, extratos acetônicos e fração acetato de etila de caule e de folhas de *E. pyrifomis* mostraram boa atividade antimicrobiana frente aos fungos leveduriformes com valores de CIM oscilando entre 7,81 e 62,5 µg/mL.

O extrato acetônico de caule e folha, e as frações acetato de etila e hidroalcoólica de folha também demonstraram relevante potencial inibitório com CIMs entre 62,5 e 125 µg/mL contra os micro-organismos Gram-positivos.

As associações entre *E. pyrifomis*-Vancomicina e *E. pyrifomis*-Fluconazol promoveram resultados favoráveis, exibindo efeitos sinérgicos sobre as cepas de *E. faecalis* e fungos leveduriformes.

A associação da fração acetato de etila de folha e Fluconazol mostrou atividade de sinergismo para *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

O trabalho apresentou resultados relevantes sobre a atividade antimicrobiana e sinérgica de *E. pyrifomis* em associação com fármacos convencionais, revelando assim seu potencial antimicrobiano.

Os resultados promissores obtidos neste estudo favorecem pesquisas posteriores com o objetivo de isolar novos compostos, elucidar mecanismos de ação, utilizar outras técnicas de combinação e realização de ensaios *in vivo*, com possibilidades de combinar o uso de extratos, frações e compostos isolados de *E*

pyriformis aos antimicrobianos tradicionais, no intuito de aumentar o potencial antimicrobiano destes agentes.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, J. S. *et al.* Antimicrobial, antiproliferative and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. **International Journal Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 4, p. 4124-40, Mar 2012.

AHMAD, A. *et al.* *In vitro* synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 59, n. Pt 10, p.1178-84, Oct 2010.

AIYEGORO, O. *et al.* Interactions of antibiotics and methanolic crude extracts of *Azelaia africana* (Smith.) against drug resistance bacterial isolates. **International Journal Molecular Sciences**, Basel, v. 12, n. 7, p. 4477-503, July 2011.

ALVARENGA, A. L. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 9, p. 86-91, 2007.

ALVES, E. G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, Abr 2008.

ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Bussum, v. 10, n. 1, p. 106-21, Jan 2009.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 5-16, Jul 2001.

APPENDINO G. *et al.* Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 71, p. 1427-1430, Aug 2008.

ARMSTRONG, L. **Estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule de *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae**. 120 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

ARMSTRONG, L.; DUARTE, M. R.; MIGUEL, O. G. Morpho-anatomy of the leaf and stem of *Eugenia pyriformis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 475-481, Jan 2012.

AYRES, M. C. B. *et al.* Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 90-97, Jan/Mar 2008.

BALAJI, V.; JEREMIAH, S. S.; BALIGA, P. R. Polymyxins: Antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Mumbai, v. 29, n. 3, p. 230-42, Jul/Sep 2011.

BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS, A.; HAUSER, W. J.; HERMANN, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHAMODY, H. J. **Manual of clinical microbiology**. 5. ed. Washington: DC: American Society for Microbiology, 1991.

BIAVATTI, M. W. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 371-378, Jul/Sep 2009.

BIESKI, I. G. *et al.* Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, New York, v. 2012, p. 1-36, 2012.

BOHLMANN, J.; KEELING, C.I. Terpenoid biomaterials. **Plant Journal**, Malden, v. 54, n. 4, p. 656-669, May 2008.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Editora Univali, 2003.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Wageningen, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug 2004.

BUSSMANN, R. W. *et al.* Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 132, p. 101-108, Oct 2010.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. 88 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

CHAHAR, M. K. *et al.* Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. **Pharmacognosy Reviews**, Mumbai, v. 5, n. 9, p. 1-12, Jan 2011.

CHEW, Y. L. *et al.* Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 11, n. 12, Feb 2011.

CHUNG, P. Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L. Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, London, v. 10, p. 25, Jun 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M07-A8**: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA, USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M38-A2**: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard Document. Wayne, PA, USA, 2008.

COLLINS, C. H. **Microbiological methods**. 7. ed. Oxford: Butterworth-Hunemann, 1995.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 272-278, Jul/Set 2005.

COUTINHO, H. D. *et al.* Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin--resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 9, p. 13, May 2009.

CUNICO, M. M. ***Ottonia martiana* Miq., Piperaceae: um estudo fitoquímico com enfoque multidisciplinar**. 188 f. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

DIAS, J. F. G. **Fitoquímica e ensaios biológicos do extrato bruto etanólico, frações e substâncias isoladas provenientes das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão (Apocynaceae)**. 135 f. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 88, n. 2, p. 308-316, Feb 2000.

DRAGO, L. *et al.* In vitro evaluation of antibiotics' combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 7, p. 111, Sep 2007.

DUDAREVA, N. S. *et al.* The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, Washington, v. 102, n. 3, p. 933-8, Jan 2005.

DUTRA, R. C. *et al.* Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 2A, p. 429-435, Abr/Jun 2009.

FARIAS, V. R. *et al.* Organização estrutural da folha de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum, Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 398-406, Apr/June 2009.

FASINU, P. S.; BOUIC, P. J.; ROSENKRANZ, B. An overview of the evidence and mechanisms of herb-drug interactions. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 3, p. 69, Apr 2012.

FENNELL, C. W. *et al.* Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 94, n. 2-3, p. 205-17, Oct 2004.

FERNANDES, T. G. *et al.* In vitro synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **The Scientific World Journal**, London, v. 2012, p. 158237, Apr 2012.

FOWLER, Z. L. *et al.* Development of non-natural flavanones as antimicrobial agents. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 10, Oct 2011.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, Cambridge, v. 3, n. 7, p. 408-414, Jul 2007.

GUINOISEAU, E. *et al.* Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infections Diseases**, Munich, v. 29, n. 7, p. 873-9, Jul 2010.

GONZALEZ-LAMOTHE, R. *et al.* Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **Intitute Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 10, n. 8, p. 3400-19, Oct 2009.

GRECO, W. R.; BRAVO, G.; PARSONS, J. C. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. **Pharmacology Review**, Bethesda, v. 47, n. 2, p. 331-85, Jun 1995.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, P. C. M. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 509-530, Out/Dez 2006.

GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, Leiden, p. 1-6, May 2011. Disponível em:
<<http://www.springerlink.com/content/g3125722r4132346/>>. Acesso em: 25/09/2012.

HAMBURGER, M. O.; CORDELL, G. A. A direct bioautographic tlc assay for compounds possessing antibacterial activity. **Journal of Nature Products**, Columbus, v. 50, n. 1, p. 19-22, Jan/Feb 1987.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, Muenchen, v. 15, n. 8, p. 639-52, Aug 2008.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of phenylpropanoids with antibiotics against bacteria. **Journal of Medicine Microbiology**, London, v. 59, n. Pt 12, p. 1469-76, Dec 2010.

HENDRA, R. *et al.* Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. **Intitute Journal of Molecular Science**, Basel, v. 12, n. 6, p. 3422-3431, May 2011.

HESKES, A. M. *et al.* Localization of oleuropeyl glucose esters and a flavanone to secretory cavities of Myrtaceae. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. e40856, Jul 2012.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instuto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 1027-1031, Oct 2002.

HUSSAIN, M. S. *et al.* Current approaches toward production of secondary plant metabolites. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, New Delhi, v. 4, n. 1, p. 10-20, Jan 2012.

KAROU, S. D. *et al.* Screening Togolese medicinal plants for few pharmacological properties. **Pharmacognosy Research**, Mumbai, v. 4, n. 2, p. 116-122, Apr 2012.

KENNEDY, D. O; WIGHTMAN, E. L. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. **Advances in Nutrition**, Bethesda, v. 2, n. 1, p. 32-50, Jan 2011.

KUETE, V. Potential of Cameroonian Plants and Derived Products against Microbial Infections: A Review. **Planta medica**, Stuttgart, v. 76, p. 1479-1491, Oct 2010.

KUMAR, A. S. *et al.* Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesia populnea* (Malvaceae) flowers with oxytetracycline. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, Bangladesh, v. 4, p. 13-16, 2009.

KUMAR, G. P.; KHANUM, F. Neuroprotective potential of phytochemicals. **Pharmacognosy Review**, Mumbai, v. 6, n. 12, p. 81-90, Jul 2012.

KUREK, A. *et al.* New antibacterial therapeutics and strategies. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 60, n. 1, p. 3-12, 2011.

LACIAR, A. M. *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia echegarayi* Hieron. (Asteraceae). **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 41, n. 4, p. 226-231, Oct/Dec 2009.

LANDRUM; L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, New York, v. 49, p. 508-536, 1997.

LEWIS, R. E. *et al.* Comparison of *Etest*, *Chequerboard* dilution and *time-kill* studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 345-51, Feb 2002.

LIMA, M. R. F. *et al.* The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 300-306, July/Sept 2006.

LIMA, I. O. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 197-201, Abr/Jun 2006.

LIMA, R. E. F.; CASSIANI, S. H. D. B. Potential drug interactions in intensive care patients at a teaching hospital. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 2, p. 222-227, Mar/Abr 2009.

LOEWE, S.; MUISCHNEK, H. Nauyn-Schmiedeberg's Arch.Exp. Path. **Pharmacology**, Bethesda, n. 114, p. 313–326, 1926.

LORENZI, H. *et al.* **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas: (de consumo in natura)**. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006, p. 640.

LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3. ed. New York: Williams & Wilkins, 1991, 1250 p.

LU, J. J. *et al.* Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2012, p. 12, Sep 2012.

MACEDO-COSTA, M. R. *et al.* Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre bactérias orais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 2B, p. 565-571, Apr/June 2009.

MAGINA, M. D. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 63, n. 3, p. 345-350, Jul 2009.

MANDALARI, G. *et al.* Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 51, n. 1, p. 83-9, Jul 2010.

MITSCHER, L. A. *et al.* Antimicrobial agents from higher plants. **Lloydia**, Cincinnati, v. 35, p. 157-166, 1972.

MITSUGUI, C. S. *et al.* Efeito antimicrobiano *in vitro* da associação de polimixina b e ceftazidima em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. **Ciência, Cuidado e Saúde**, Maringá, v. 7, n. 1, p. 76-81, 2008.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, n. 1, p. 163-94, Jan 2005.

NASCIMENTO, P. F. C. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, Jan/Mar 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 75, p. 311-335, Feb 2012.

OLAJUYIGBE, O. O.; AFOLAYAN, A. J. Synergistic Interactions of Methanolic Extract of *Acacia mearnsii* De Wild. with Antibiotics against Bacteria of Clinical Relevance. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 7, p. 8915-32, Jul 2012.

OLIVEIRA, A. M. *et al.* Phytochemical studies of the extracts of stem bark and leaves of *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae) and evaluation of their molluscicidal and larvicidal activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 16, p. 618-624, Dec 2006.

OLIVEIRA, E. N. A. *et al.* Obtainment of dehydrated ubaia by lyophilization process. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 4, n. 2, p. 235-242, 2010.

OTLES, S.; YALCIN, B. Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2012, p. 1-12, Apr 2012.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 301-307, Apr/June 2008.

OYEDEMI, S. O. *et al.* Phytochemicals Analysis and Medicinal Potentials of Hydroalcoholic Extract from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm Stem Bark. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 5, p. 189-203, May 2012.

PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Turin, v. 140, p. 164-168, Jun 2010.

PETERSEN, P. J. *et al.* *In vitro* antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by *Chequerboard* and *Time-kill* kinetic analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 573-6, Mar 2006.

PEI, R. S. *et al.* Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. **Journal of Food Science**, Malden, v. 74, n. 7, p. M379-83, Sep 2009.

PUHL, M. C. M. N. *et al.* Antimicrobial activity of *Piper gaudichaudianum* Kuntze and its synergism with different antibiotics. **Molecules**, Basel, v. 16, n. 12, p. 9925-38, Dec 2011.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, May 2002.

PINTO, E. *et al.* Antifungal activity of clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and *dermatophyte* species. **Journal of Medical Microbiology**, London, n. 58, p. 1454–1462, Nov 2009.

PRASHAR, A. *et al.* Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, Leiden, v. 63, n. 5, p. 569-575, Jul 2003.

RAHALISON, L. M. *et al.* Antifungal tests in phytochemical investigations: comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 60, n. 1, p. 41-4, Feb 1994.

RAMIREZ, L. S.; CASTAÑO, D.M. Metodologias para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. **Scientia et Technica Año XV**, Risaralda, n. 42, Ago 2009.

RAVI, K.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Andover, v. 43, n. 9, p. 1433-9, Sep 2005.

RICE, L. B. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. **American Journal of Medicine**, Tucson, v. 119, n. 6, p. 11-9, Jun 2006.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 100, n. 1-2, p. 80-4, Aug 2005.

ROMAGNOLO, M. B; SOUZA, M. C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 529-548, 2006.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: UFV, 2001, 279 p.

ROSATO, A. *et al.* Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. **Phytomedicine**, Muenchen, v. 14, n. 11, p. 727-32, Nov 2007.

SAHOO, N. *et al.* Herbal drugs: standards and regulation. **Fitoterapia**, Leiden, v. 81, n. 6, p. 462-471, Sep 2010.

SALEEM, M. *et al.* Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 27, n. 2, p. 238-254, Feb 2009.

SÁNCHEZ, E.; GARCIA, S.; HEREDIA, N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 20, p. 6888-94, Oct 2010.

SANTOS, A. O. *et al.* Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 3, p. 277-281, Mai 2008.

SARAIVA, A. M. *et al.* Antimicrobial activity and bioautographic study of antistaphylococcal components from *Caesalpinia pyramidalis* Tull. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 48, n. 1, Jan/Mar 2012.

SASAKI, C. M. **Estudo Fitoquímico e Avaliação das atividades alelopáticas e antimicrobianas das partes aéreas de *Pterocaulon lorentzii* MALME (Asteraceae)**. 115 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. C. *et al.* Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 21, n. 2, p. 183-186, Nov 1987.

SILVA, D. B. *et al.* Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de annonaceae. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1809-1812, 2007.

SILVA, L. L. S. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 208-214, Apr/May 2010.

SIMOES, M. *et al.* Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 26, n. 6, p. 746-57, Jun 2009.

SIQUEIRA, C. F. Q. *et al.* Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: evaluating bioprospecting strategies. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2012, p. 1-7, Sep 2012.

SOUZA, V. C; LORENZI, H. **Botânica sistemática**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

STEFANELLO, M. E. A. *et al.* Composição Química e Variação Sazonal dos Óleos Essenciais de *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 28, n. 3, p. 449-453, 2009.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, Araraquara, v. 34, n. 3, p. 7-13, 2009.

SULEIMAN, M. M. *et al.* Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected South African tree species. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines**, New York, v. 7, n. 1, p. 64-78, Oct 2009.

TANAKA, J. C. A. S. *et al.* Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 834-837, Jul 2005.

TEKE, G. N. *et al.* Antimicrobial and antioxidant properties of methanol extract, fractions and compounds from the stem bark of *Entada abyssinica* Stend ex A. *Satabie*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 11, p. 57, Jul 2011.

THEODULOZ, C. *et al.* Xanthine oxidase inhibitory activity of *Paraguayan Myrtaceae*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 24, p. 179 -183, Dec 1988.

THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current Opinion Plant Biology**, Cambridge, v. 9, n. 3, p. 297-304, Jun 2006.

TIM CUSHNIE, T. P.; LAMB, A.L. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Oxford, v. 26, n. 5, p. 343-356, Nov 2005.

TIWARI, B. K. *et al.* Application of natural antimicrobials for food preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 57, n. 14, p. 5987-6000, Jul 2009.

WACHTEL-GALOR, S.; BENZIE, I. F. F. **Herbal Medicine: An Introduction to Its History, Usage, Regulation, Current Trends, and Research Needs**. 2. ed. Boca Raton (FL): CRC Press, 2011.

WEIDNER, S. A. *et al.* Extracts of phenolic compounds from seeds of three wild grapevines-comparison of their antioxidant activities and the content of phenolic compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 3, p. 3444-3457, Mar 2012.

WILSON, P. G. *et al.* Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany**, Davis, v. 88, n. 11, p. 2013-25, Nov 2001.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, Leiden, v. 64, p. 3-19, 2003.

WINK, M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. **Current Drug Metabolism**, Cambridge, v. 9, p. 996-1009, Dec 2008.

WOLSKA, K. I.; GRZEŚ, K.; KUREK, A. Synergy between novel antimicrobials and conventional antibiotics or bacteriocins. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 61, n. 2, p. 95-104, 2012.

YU, R. *et al.* Daptomycin-nonsusceptible, vancomycin-intermediate, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, Ontario, v. 23, n. 2, p. e48-50, 2012.

ZAGO, J. A. A. *et al.* Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 828-833, Oct/Dec 2009.

ZARAI, Z. *et al.* The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. **Lipids in Health and Diseases**, London, v. 10, p. 161, Sep 2011.

ANEXO

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICAÇÃO DE ADIÇÃO

 INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL 15/05/2013 015130001561 12:05 DEPR  0000421303521323	Espaço reservado para a etiqueta	Espaço reservado para o código QR
 INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Sistema de Gestão da Qualidade Diretoria de Patentes		
	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA
Título do Documento: Petição Relacionada com Pedido		Página: 1/3 Código: FQ002 Versão: 2 Procedimento: DIRPA-PQ007

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

1. Interessado:

1.1 Nome: Universidade Federal do Paraná

1.2 Qualificação: Autarquia Federal

1.3 CNPJ/CPF: 75095679/0001-49

1.4 Endereço Completo: Rua João Negrão, 280 Curitiba/PR

1.5 CEP: 80010-200

1.6 Telefone: 41-3360.7441 1.7 Fax: 41-3360.7416

1.8 E-mail: inovacao@ufpr.br

☐ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

2.1 Número: BRI0201215245-2 2.2 Data de Depósito: 20/06/2012

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição (54):
 PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS
 ORIGINÁRIOS DA ESPÉCIE VEGETAL Eugenia pyriformis Cambess, Myrtaceae